

**Über den Einfluß von Temperatur-, Druck-
und Zeitkonstanten
auf eine Methode der Methacrylateinbettung
organischer Gewebe**

Fritz Bayerlein

—
1970
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abt. für Knochenmarksdiagnostik an der Med.
Klinik Innenstadt der Universität München (Direktor:
Prof. Dr.E.Buchborn) und aus der Abt. Hämatomorpho-
logie am Institut für Hämatologie der Ges. f. Strahlen-
u. Umweltforschung mbH , Assoziation mit EURATOM,
München (Vorstand: Prof. Dr. R. Burkhardt).

Über den Einfluß von Temperatur-, Druck-
und Zeitkonstanten auf eine Methode der
Methacrylateinbettung organischer Gewebe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Fritz Bayerlein
aus München

1978

Mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.R.Burkhardt

Mitherberichterstatter: Prof. Dr.E.Buchborn

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1978



Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
Einleitung	1
1. Literaturüberblick	1
2. Eigene Untersuchungen	8
2.1. Material, Reagenzien	9
2.2. Beispiel eines Versuchsablaufes	9
a) Vorbereitende Maßnahmen	9
b) Fixier- und Einbettungsautomat	10
c) Methodik der Auswertung	13
1. Photographisch	13
2. Chemisch	15
3. Modellversuch zur Prüfung des Diffusionsverhaltens der Fixierlösung	16
4. Mikroskopisch	27
2.3. Fehlerkontrollen der Auswertung	27
2.4. Versuchsergebnisse	35
a) Abschnitt Fixation	35
b) Abschnitt Entwässerung	53
c) Abschnitt Einbettung	61
3. Diskussion	69
4. Zusammenfassung	72
5. Literaturverzeichnis	73

Über den Einfluß von Temperatur-, Druck- und Zeitkonstanten auf eine Methode der Methacrylateinbettung organischer Gewebe.

von Fritz Bayerlein

Einleitung.

Nach ihrer Einführung zur Herstellung von ultradünnen Schnitten sind Einbettungsmedien auf Methacrylatbasis auch in der lichtmikroskopischen Histologie in Gebrauch gekommen. Sie haben sich besonders bewährt bei der Präparation von Knochenmark im Zusammenhang mit dem knöchernen Gerüst und bei der Anfertigung von unentkalkten Knochenschnitten. Lediglich der relativ große Aufwand behindert noch ihre routinemäßige Anwendung, die wegen der bedeutenden Vorteile auch auf anderen Gebieten wünschenswert erscheint. Zahlreichen empirisch ermittelten Modifikationen ist es bisher nicht gelungen, den für ein optimales Ergebnis erforderlichen minimalen technischen Aufwand zu ermitteln. Grundlagen hierzu hat BURKHARDT (7) beigetragen. Die vorliegende Untersuchung geht darum von der von BURKHARDT für Übersichtspräparate von spongiösen Knochen angegebenen Kombination von Methanol-Formolfixation, Methanolentwässerung und Einbettung in Methyl-Methacrylat-Nonylphenol-polyglycolesteracetat-Gemisch aus (8). Mit Hilfe einer eigens hergestellten Apparatur konnten diese Vorgänge erstmals unter wählbaren und konstant aufrecht zu erhaltenden Druck-, Temperatur- und Zeitbedingungen beobachtet werden. Die große Zahl von Variationsmöglichkeiten, die sich aus den zahlreichen wirksamen Variablen ergibt, erforderte eine Beschränkung in der Anzahl der Varianten, die Untersuchungen folgten einem vorher erstellten Modell. Aus den Beobachtungen ergaben sich einige wichtig erscheinende Randfragen, denen mit einer Reihe von Zusatzversuchen Rechnung getragen wurde.

1. Literaturüberblick.

1958 und 1959 haben BOELLARD und HIRSCH (5 , 6) in zwei grundlegenden Arbeiten über Methacrylsäureester als Einbettungsmittel in der lichtmikroskopischen Histologie berichtet. Sie stellen die Vorteile dieser neuen Methode gegenüber der bis dahin allgemein gebräuchlichen Paraffineinbettung heraus und erreichen, vor allem durch Kombination von Acrylat mit Weichmachern gute Schnitteigenschaften.

1963 stellt CATHEY ein Methacrylateinbettungsverfahren vor, bei dem Weichmacher (Polyacethylenglycol) und als Startersubstanz Benzoylperoxid verwendet werden. CATHEY untersuchte verschiedene Fixierlösungen und fand Zenker-Formol und Formalin am geeignetsten. Die Entwässerung erfolgt bei Raumtemperatur in 70 % Äthanol und drei Portionen Aceton. Einer Blasenbildung wird durch Vacuum vorgebeugt, die Polymerisation verläuft bei 50°C.

1964 setzen EGER et al. (13) zur Herstellung von Knochenschliffen einen Unterdruck von 30 Torr und berichten über ein dadurch beschleunigtes Eindringen von stabilisiertem Methylmethacrylat.

1966 gibt BURKHARDT (7) erstmals genauere Daten über den Einfluß einer von ihm angegebenen Einbettungsmethode auf den Querschnitt von Milzstückchen. Die Veränderungen betragen: Nach Fixation + 3,29 %, nach Entwässerung - 1,66 % und nach Abschluß der Gesamteinbettung +7,91 %. Das aus dieser Methode entwickelte automatisierte Verfahren beansprucht für Knochenbiopsien von 4mm Durchmesser insgesamt ca. 70 Stunden.

1969 berichtet BURKHARDT (8) in einer weiteren Arbeit von Verbesserungen des Verfahrens, für die Fixation werden 6 Stunden, für Entwässerung 9 Stunden, für das Eindringen des Acrylatgemisches 18 Stunden, für die Vorpolymerisation 45 Minuten und für das Aushärten der klaren Kunststoffblöckchen 24 bis 36 Stunden angegeben.

1969 benutzen ZAMBERNARD et al. (20) einen Unterdruck von 500 bis 600 mmHg in einem Exsiccator, um das Eindringen des Einbettungsgemisches zu beschleunigen. Die Polymerisation läuft danach über 8 Stunden, 4 Stunden davon unter UV-Licht, weitere 4 Stunden im Wärmeschrank bei 56°C.

1970 beschreiben von PETERSDORFF et al. (14) ein Verfahren zum Einbetten und Schneiden von Knochenkompakta speziell für polarisationsoptische Untersuchungen. Die Knochenstücke werden in 0,5 cm dicke Scheiben zersägt und 20 Stunden mit einem Fixierbad nach BURKHARDT(7) behandelt. Die Entwässerung erfolgt in 5 Portionen absolutem Methanol mit Zusatz von Linde-A 3 - Exsiccator. Um eine vollständige Entwässerung der Knochenstücke zu erreichen empfehlen von PETERSDORFF et al.

eine Zentrifugierung in Methanol von 30 Minuten Dauer bei 2500 U-min. und geben für die Entwässerung eine Gesamtdauer von ca. 22 Stunden an. Für die Durchtränkung wird Einbettungsgemisch modifiziert nach BURKHARDT (7) verwendet. Die Dauer der Durchtränkungsphase beträgt 2 Tage, die Knochenstücke werden dabei einem Unterdruck von - 15 Torr ausgesetzt. Die Vorpolymerisation verläuft luftdicht abgeschlossen im Wasserbad 50 Minuten bei 47°C. Zum Aushärten der Kunststoffblöcke wird eine Temperatur von 34°C gewählt, die konstant zwei Tage lang in einem Wärmeschrank einwirken soll. Die Gesamtdauer der Methode liegt demnach bei ca. 7 Tagen.

1972 empfiehlt DELLING (11) eine vereinfachte MMA-Einbettung für unentkalkte Knochenschnitte. Er verzichtet auf jeglichen Unterdruck, läßt das Einbettungsgemisch 24 Stunden bei 4°C auf die Proben einwirken, bringt sie dann für 24 Stunden bei 32°C in den Wärmeschrank und erhöht - je nach Polymerisationsverlauf - nach 12 Stunden jeweils die Temperatur um 2°C. Damit soll eine gute Steuerbarkeit der Polymerisation ohne innere Überhitzung und Blasenbildung erreicht werden.

1972 erscheint ein Bericht von BERTOLINI et al (4) über Quellung von Kollagen nach unterschiedlicher Fixation. Es werden 6 Fixierlösungen und 28 verschiedene Imbibitionsmedien untersucht, die geringste Quellungsrate bringt die Kombination 35 % Formaldehyd als Fixierlösung (20 h) und Methanol als Imbibitionsmedium (200 h): plus 4 %.

1973 berichtet SINGLETON (16) über die Verwendung einer elektromotorkontrollierten Vakuumpumpe im Zusammenhang mit der Kunststoffeinbettung von Schädelknochen. Es wird dadurch ein kontrollierter Unterdruck von -10 bis -25 mmHg aufrecht erhalten. Leider enthält die Arbeit keine Hinweise über die Auswirkungen des Unterdrucks auf das histologische Ergebnis.

1974 schlägt DIFFORD (12) eine vereinfachte Methode der MMA-Einbettung vor. Die Neuerung gegenüber früheren Verfahren besteht darin, daß als Einbettungsmedium ein Gemisch aus monomerem MMA und bereits anpolymerisierten Makromolekülen (Polyacrylat) in Verbindung mit Benzoylperoxid als Katalysator gewählt wird. Die Fixierung soll 3 Tage dauern, die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe 3 Tage, das Durchtränken mit den Einbettungsgemischen weitere 3 Tage bei einer Temperatur von 0 - 4°C. Die Polymerisation erfolgt in einem

Wasserbad von 37°C und nimmt 1 - 3 Tage in Anspruch. Der Zeitaufwand für die angegebene Art der Präparation ist also erheblich.

1974 schildert POTTER (15) eine Kunststoffeinbettungsmethode für Knochenmarkspunktate, die mindestens 8 Stunden lang in einem Gemisch aus absolutem Isopropanol und 15% Formalin (1:1) fixiert werden. Durch Spülung mit 70 % Äthanol werden die Markbestandteile aus dem fixierten Punktat isoliert und über aufsteigende Alkoholreihe (75 min.) entwässert. Die durchtränkung der Proben erfolgt zunächst in einem Gemisch aus absolutem Äthanol und monomerem MMM zu gleichen Teilen, danach in drei Portionen monomerem MMA; die Polymerisation läuft bei 60°C über Nacht in einem Wärmeofen ab. Das Verfahren ist relativ zeitsparend, doch ist dabei zu berücksichtigen, daß die Proben klein sind und POTTER sich auf drei Standardfärbungen beschränkt.

1975 veröffentlicht STICKLAND (17) eine Arbeit über den Einfluß von verschiedenen Fixierlösungen auf tierisches Gewebe hinsichtlich Volumenänderungen. Er benutzt als protoplasmaähnliche Substanz Gelatin-Albumin und findet für eine 5-stündige Fixation mit 10% Formalin eine Quellungsrate von +9 %. Unterschiedliche Formalinkonzentrationen bringen unterschiedliche Quellungseffekte. Eine Reihe anderer Fixierlösungen führen teilweise zu erheblichen Gewebeschrumpfungen. STICKLAND betont, daß sich von einer abgeschlossenen Fixation nicht sicher auf eine Stabilisierung der Proben gegen spätere Volumenänderungen schließen läßt!

1975 vergleichen AGODOA et al. (1) die Einbettung von Nierenbiopsien in Paraffin und in Methacrylat und verweisen auf die Vorzüge der Kunststoffeinbettung: Geringerer Zeitaufwand, bessere und umfassendere Färbbarkeit, geringere Schnittdicke und Möglichkeit von Enzymbestimmungen. AGODOA benutzt Glycol-Methacrylat, fixiert 2 bis drei Stunden in 6,25%-Glutaraldehyd und gibt für die Acrylatdurchtränkung der Proben 2 Stunden an. AGODOA weist auf eine weitere Arbeit hin, die sich in Druck befindet (2) und nähere Einzelheiten enthält.

1976 berichten BENNET et al. (3) ausführlich über ein Glycol- Methacrylateinbettungsverfahren, bei dem die Proben 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert werden; die Entwässerung erfolgt in aufsteigender Alkoholreihe bis zu 95% Äthanol. Die Durchtränkungsdauer im Einbettungs-

gemisch richtet sich nach der Größe der Proben, bei stündlichem Wechsel genügen in der Regel 3 Portionen. Die Polymerisation verläuft bei 38 bis 40°C im Wärmeschrank zwischen 15 und 96 Stunden, Steigerung der Temperatur auf 60°C gegen Ende beschleunigt die Aushärtung ohne negative Effekte auf die Zellstrukturen. BENNETT verweist auf die günstigen Eigenschaften des Glycol-Methacrylats (Wasserlöslichkeit) und die geringe Eignung von Epoxy-Kunststoffen hinsichtlich der Färbungen (z.B. Verlust der Eosinophilie). Bei der histologischen Beurteilung seines Verfahrens stellte er Quellung der Erythrozyten in den Randbereichen der Proben fest, wobei er als Ursache die höhere Osmolarität des Fixiermittels annimmt. Weiterhin berichtet er von Mikrovakuolen in den Probenzentren, die durch Gasentwicklung bei ungleichmäßiger Polymerisation verursacht werden.

1976 geben STOUT et al. (18) ein Verfahren zur Kunststoffeinbettung unentkalkten archeologischen Knochenmaterials an, wobei die Probengröße in der Regel 2 x 2 x 1,5 cm beträgt. Die Entwässerung erfolgt über aufsteigende Alkoholreihe (24 h), die Durchtränkung beginnt in einem Gemisch aus Äthanol abs. und monomerem unkatalysiertem MMA (8 h), daran schließt sich eine langsame Polymerisation bei Raumtemperatur über 5 Tage in reinem MMA. Schließlich werden die Proben bis zum völligen Aushärten bei 40°C in einem Wärmeschrank belassen.

1976 beschreiben DANCEY et al. (10) ein Verfahren zur Einbettung von Nadelbiopsien aus dem Knochenmark. Es werden verschiedene Fixationsvarianten versucht, wobei gepuffertes Acrolein (pH 7,2 - 7,4) am besten abschneidet. Änderungen der Temperatur zwischen + 37°C und Raumtemperatur bringen als Ergebnis eine deutliche Beschleunigung der Fixation bei Temperaturerhöhung, über histologische Auswirkungen dieser Modifikation wird leider nichts angegeben. Entwässerung und Einbettung erfolgt im wesentlichen nach ZAMBERNARD (20).

1976 berichten VYCOUPIL et al. (19) über eine kombinierte Anwendung von Glycol- und Methylmethacrylat. Die Fixation der Knochenbiopsien erfolgt in 4% gepuffertem Formaldehyd nach SABATINI zwischen 6 und 24 Stunden. Entwässert wird in stabilisiertem Glycol-Methacrylat über 2 Stunden, um damit - ohne Anwesenheit von Alkohol - die Enzymaktivität zu erhalten. Die Einbettung verläuft nach BURKHARDT (8).

In letzter Zeit wurden mehrere Arbeiten veröffentlicht, in denen Epoxy-Harze zur Verwendung als Einbettungsmedium empfohlen werden. Diese Methoden sind dort, wo hohe Anforderungen an spezifische Färbungen und Differenzierbarkeit gestellt werden, nicht geeignet, denn das Einbettungsmittel kann vor dem Färbevorgang nicht entfernt werden. Auch behindert das schlechte Eindringen der Epoxy-Harze die Präparation größerer Gewebestücken.

Zusammenfassung:

Aus diesen Angaben lassen sich folgende wesentliche Probleme der lichtmikroskopischen Methacrylateinbettung erkennen:

1. Eine große Zahl der für hämatologische Übersichtszwecke geeigneten Fixationsgemische bringt die Vorzüge der gewebeschonenden Methacrylateinbettung unvollkommen zur Geltung. Dies gilt nicht für das gleichmäßig eindringende Formol-Methanolgemisch, vorausgesetzt, das polymerisationsverzögernde Formol wird sorgfältig entfernt. Einflüsse von verschiedenen Drucken und Temperaturen auf diese Fixation wurden bisher nicht geprüft.
2. Die sorgfältige Entwässerung und Entlüftung erscheint als wesentliche Voraussetzung der ungestörten Polymerisation von MMA. Auch für diesen Schritt sind Modifikationen der Zeit- Druck- und Temperaturkonstanten nicht erprobt.
3. Die nach der relativ lipidschonenden Formol-Methanolvorbereitung verbleibenden Lipide können die Polymerisation von MMA erheblich stören. Unter den zur besseren Schneidbarkeit zuzufügenden sogenannten "Weichmachern" hat Plastoid N einen relativ günstigen Einfluß auf die Unterdrückung dieser Störung. Vorteilhaft sind ferner die mechanischen Eigenschaften dieser Beimengung, sowie das Fehlen der Hygroskopie, das gute Durchdringvermögen und das glasklare Polymerisationsprodukt.
4. Ein relativ hoher Zusatz von Benzoylperoxyd begünstigt gleichmäßiges Polymerisieren, erfordert jedoch genaues Einhalten der Polymerisationstemperatur und Zeit.
5. Ungleichmäßige Polymerisation wird meistens auf technische Fehler während des Polymerisierens zurückgeführt, gelegentlich wird als Ursache unzureichende Vorbehandlung der Proben angegeben.

6. Ausreichende Fixation bedeutet nicht unbedingt Stabilisierung gegen Volumenänderung und Zellschädigung in späteren Präparationsabschnitten.
7. Die Zeitangaben für die einzelnen Abschnitte differieren erheblich, selbst wenn man unterschiedliche Proben, unterschiedliche Reagenzien und unterschiedliche Ansprüche an Färbeergebnisse berücksichtigt.

2. Eigene Untersuchungen .

2,1 Material, Reagenzien .

Als Versuchsmaterial wurden insgesamt 40 Schweinemilzen verwendet, die direkt aus dem Schlachthof besorgt wurden. Die Zeit zwischen Schlachtung und Beginn der Fixierung hat 65 Minuten nicht überschritten, der Durchschnittswert lag bei 54 Minuten. ⁺⁾
Für jede Versuchsanordnung wurde nur eine Milz verwendet. Schweinemilzen haben sich für ähnliche Versuche schon früher bewährt; Quellungs- und Schrumpfungsvorgänge sind gut und leicht festzuhalten, der gewebliche Aufbau ist ziemlich gleichmäßig, er weicht von dem des menschlichen Knochenmarks nicht allzuweit ab. Als Ausgangsmethode dienten die früher von BURKHARDT (7) entwickelten Fixations- Entwässerungs- und Einbettungsverfahren.

Reagenzien :

- Für die Fixierung: a) Gemisch nach Schaffer in folgender Modifikation: Methanol pur. 100 ml, Formol pur 54,7 ml, Glucose-Phosphatpuffer pH 7,4 4,4 ml.
b) Formol pur. (35% Formaldehyd in H₂O).
c) Methanol pur .

Für die Entwässerung: Methanol pur.

Für die Einbettung: Gemisch aus Methylmethacrylat (über Aluminiumoxyd entstabilisiert) 100,0 ml, Nonylphenol-polyglycoläther-acetat = Plastoid N (Firma Röhm & Haas, Darmstadt) 25,0 ml, Benzoylperoxyd (Initiator) 3,5 g.

Zum Nachweis der Entwässerung: Karl-Fischers-Reagens
(Lösung A: Pyridin-SO₂)
(Lösung B: Jodlösung).

⁺⁾ Für das freundliche Entgegenkommen bedanke ich mich an dieser Stelle herzlich bei den Kollegen von der Veterinärmedizin des Münchner Städtischen Schlacht- und Viehhofes!

Zur Messung der Wanderungsgeschwindigkeiten der Fixationsmittel:
Chromatographiepapier "Whatman Nr. 1". Schiffisches Reagens zum
Nachweis von Formaldehyd.

Als Fotomaterial: Ilford FF₄. Schwarz-weiß-Negativfilm, 14/10 Din.
Agfa-Color-CT-Tageslichtumkehrfilm, 18/10 Din.

2,2 Beispiel eines Versuchsablaufes:

a: Vorbereitende Maßnahmen: Aus der kürzlich entnommenen Milz wird auf einem angefeuchteten Holzbrettchen mit einem scharfen Rasiermesser das zähe und schwer zu schneidende Hilusgewebe entfernt. Sodann wird mit einem Doppelmesser (Schneidenabstand 5 mm) senkrecht zum Hilusverlauf eine Gewebescheibe herausgeschnitten, die der Anatomie gemäß eine dreieckige Form hat. Mit Hilfe eines zweiten Doppelmessers (Schneidenabstand 12 mm) werden aus der Nähe der Basis dieses Dreieckes quadratische Stückchen ohne Kapselanteile entnommen, um ein gleichmäßiges Eindringen der später einwirkenden Flüssigkeit zu gewährleisten. Auf diese Weise werden insgesamt 10 Milzblöckchen gewonnen und zunächst im Nativzustand fotografiert: Dazu werden sie nebeneinander auf einen parallel zur Filmebene verschiebbaren Schlitten gebracht, der mit Millimeterpapier und Zahlenmarken versehen ist. Über dem Schlitten ist eine Spiegelreflex-Kleinbildkamera mit Balgengerät fest justiert. Auf diese Weise können in kurzer Zeit identifizierbare Abbildungen in gleichem Maßstab erhalten werden. Nun werden die Proben mit einer angefeuchteten anatomischen Pinzette in markierter Reihenfolge in das Probengefäß des Einbettungsautomaten gebracht. Nach den verschiedenen Präparationsschritten werden jeweils zwei aufeinanderfolgende Milzstückchen entnommen und in derselben Weise fotografiert, aus den beiden gleichbehandelten Proben wird der Mittelwert der Flächenänderung bzw. der Eindringtiefe für einen bestimmten Zeitpunkt der Präparation erhalten. Nach dem Fotografieren werden die Proben auf immer dieselbe Weise von Hand weiterbehandelt, um nach Abschluß der Gesamtpräparation eine histologische Beurteilung durchführen zu können. Insgesamt fallen pro Versuch 5 Probenpaare an, man kann also 5 verschiedene Entnahmezeiten wählen, wobei Druck- und Temperaturänderungen je eine eigene Versuchsreihe erfordern.

b: Fixier- und Einbettungsautomat. Der verwendete Automat wurde in Analogie zu einer speziell für die Routine der Acrylateinbettung entwickelten Apparatur (Literatur siehe VIII. Congress ISH) von Herrn Dr. med. Peter Gabel konstruiert. ⁺⁾ Dieser Apparat mußte im Rahmen dieser Arbeit den Bedingungen des Dauerbetriebs angepaßt werden. Diese zeitraubenden Vorarbeiten, Voraussetzung aber nicht Gegenstand dieser Untersuchung, sollen hier nur kurz erwähnt werden: Verbesserung der Vakuum- und Kühlanlagen, der Kühleisolation und der Regeleinrichtungen. Den Zweck der Arbeit mag eine kurze Beschreibung des Funktionsablaufes an Hand der Abbildungen und Schemazeichnungen genügen (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Im Gegensatz zu den bisher bekannten Einbettungsautomaten werden die Proben nicht von Gefäß zu Gefäß fortbewegt, sondern sie bleiben in einem Probengefäß (PG) dessen Inhalt durch Rührautomatik gemischt und durch Teflonventile automatisch ausgetauscht wird. Die Automatik kann durch Handsteuerung oder Programmschaltung betätigt werden. Das Programm umfaßt die Einstellung von Spül- und Austauschintervallen mittels Zeitrelais (ZR). Die Temperatur ist im Bereich zwischen + 2 und + 22°C mit Thermostat regelbar, dessen Abtaster (Th) sich im Probengefäß befindet. Dazu dient ein geschlossenes Flüssigkeitskühlsystem (KWM), das das Probengefäß von außen umspült. Der Druck im Probengefäß ist ^{über} ein mit Transistoren in bestimmten Höhen versehenes Quecksilbermanometer (VM) einstellbar, dessen Impulse eine Vakuumpumpe in Betrieb setzen. Die Vorratsgefäße für Methanol-Formol (VF), Methanol (VE) und Acrylat (VA) werden mit Hilfe von Unterdruck beschickt. Das im Verlauf des Programmes entstabilisierte Acrylat wird in einem Mischgefäß (M) zusammen mit dem zunächst noch von Hand einzubringenden Plastoid N und Benzoylperoxyd zum fertigen Einbettungsgemisch aufbereitet. Die Füllhöhe ist durch eine Lichtschranke, die ein im Gefäß befindlicher Käfigschwimmer mit Dunkelmarkierung auslöst, einstellbar. Der Ablauf eines normalen Programmes gliedert sich in vier Schritte:

⁺⁾ Herrn Dr. Gabel sei an dieser Stelle für seine Unterstützung bei der Inbetriebnahme besonders gedankt.

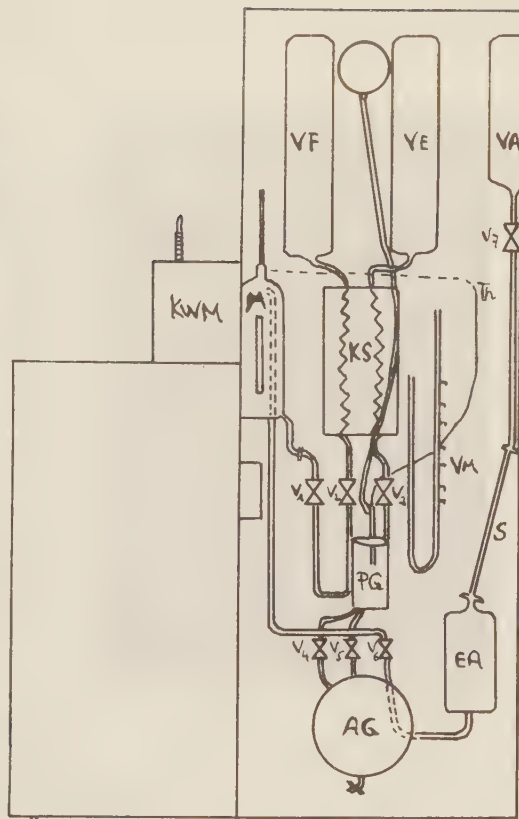
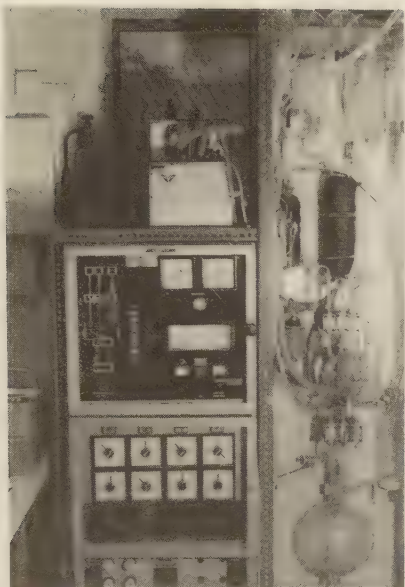


Abb. 1

V F = Vorratsgefäß für Fixierlösung
 V E = Vorratsgefäß für Methanol
 V A = Vorratsgefäß für stab. Acrylat
 S = Säule z. Entstab. d. Acrylats
 EA = Auffanggef. f. entstab. Acrylat
 M = teilsoliertes Mischgefäß für
 Einbettungsgemisch mit Kühlmantel,
 Höheneinstellungslichtschranke
 und Rührwerk
 PG = Probengefäß mit Kühlmantel,
 Steigleitung und Rührwerk
 Th = Fernthermometer
 VM = Vakuummeter mit Transistoren
 AG = Auffanggefäß für Spülflüssigkeit
 KS = Kühlschlange f. Fixans- und Ent-
 wässerungsmittelzulauf
 KWM = Kühlwassermischgefäß mit
 Thermostat

V₁ = Einbettungsgemisch-
 zulaufventil
 V₂ = Entwässerungsmittel-
 zulaufventil
 V₃ = Fixanszulaufventil
 V₄ = Tropfablaufventil
 V₅ = Probengefäßablaufventil
 V₆ = Mischgefäßzulaufventil
 f. entstab. Acrylat
 V₇ = Säulenzulaufventil für
 stabilisiertes Acrylat

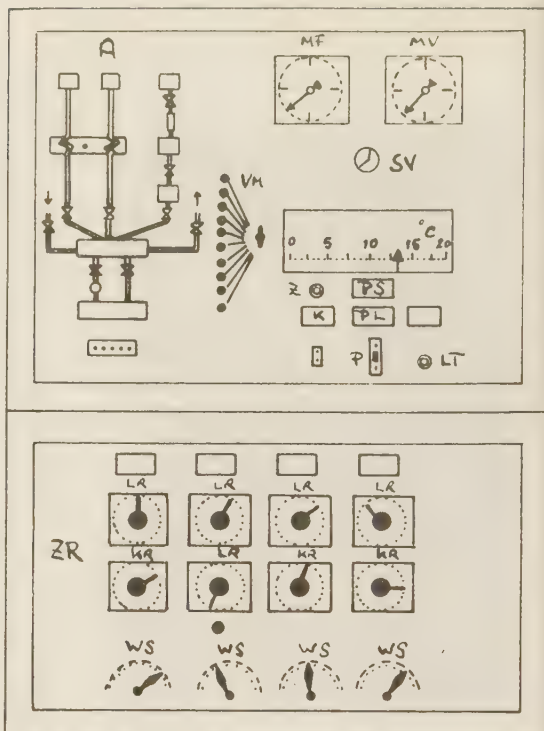
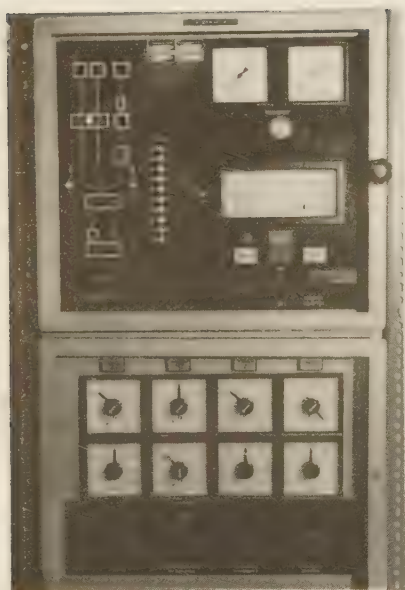


Abb. 2

- A = Automatikskizze mit Schaltknöpfen für Ventile und Rührwerke von Hand
 MF = Manometer für Stickstoff-Flaschendruck
 MV = Manometer für Stickstoff-Ventildruck
 SV = Stickstoffsperrventil
 VM = Anzeigeleuchten des Vakuummeters mit Wählschalter
 KS = Kühlschalter
 K = Kühlungslichtanzeige
 Z = Kühlzuschaltlichtzeichen für Einbettungsgemischgefäß
 P = Schiebeschalter für Programmstart und Programmunterbrechung
 PS = Lichtanzeige für Programmstartbereitschaft
 PL = Lichtanzeige für laufendes Programm
 ZR = Zeitrelais
 KR = Kurzzeitrelais für Ab- und Zulaufzeiten
 LR = Langzeitrelais für Zeitabstände der Flüssigkeitswechsel
 WS = Schalter für die Zahl der Flüssigkeitswechsel in den einzelnen Abschnitten
 LT = Programmlöschtaste

Fixierung
Entwässern I
Entwässern II
Einbetten

Während jedes dieser vier Schritte wird im Probengefäß die Flüssigkeit mehrmals in konstanten Abständen ausgetauscht. Im Abschnitt Entwässern I erfolgt ein tropfenweiser Austausch zwischen Fixierlösung und Methanol, um einem zu raschen Anstieg der Alkoholkonzentration mit zellschädigender Wirkung vorzubeugen. Die Tropfzeit wurde über sämtliche Versuche konstant bei einer halben Stunde belassen, das Tropfventil (V_4) dabei so eingestellt, daß genau eine Probengefäßfüllung ausgetauscht wurde.

Nach Abschluß des Abschnittes Einbetten schließt sich außerhalb der Automatik eine 12-stündige Evakuierung im Exsikkatorgefäß bei -15 mmHg unter Lichtabschluß an. Dann folgen Vorpolymerisation und Polymerisation wie früher beschrieben (siehe Seite 2 Mitte).

Auf diese Weise wurden völlig konstante Bedingungen für die verschiedenen Schritte der histologischen Präparation erreicht.

c: Methodik der Auswertung:

1. Photographisch

Der Vorgang des maßstäblich genauen Photographierens wurde bereits beschrieben. Zur Auswertung werden die Negative auf 9x12 cm Papierformat vergrößert. Millimeterpapier und Zahlenmarken, die mitphotographiert wurden, sichern Maßstäblichkeit und Unverwechselbarkeit der Probenabbildungen. ⁺⁾ Aus den vergrößerten Papierkopien werden die Probenabbildungen möglichst exakt ausgeschnitten und mit einer Analysenwaage gewogen. Zum Ausgleich evtl. unterschiedlicher Photopapierdicken werden aus jedem Photo mit einer Hohlstanze zwei runde Papierproben entnommen und extra gewogen. Der Mittelwert des Gewichts wird als Korrekturfaktor in die Berechnung einbezogen. Für die Berechnung der prozentualen Flächenänderung (der Nativzustand sei dabei 100%) während eines präparatorischen Abschnittes ergibt sich damit die folgende Formel:

$$\frac{A_2 \cdot St_1 \cdot 100}{A_1 \cdot St_2} = \text{prozentuale Flächenänderung}$$

+) Fr. Hoffmann vom Fotolabor sei für ihre Hilfe herzlich gedankt!

Dabei ist:

A_1 = Gewicht der Abbildung des Nativzustandes (Photo 1)

A_2 = Gewicht der Abbildung nach Präparation (Photo 2)

St_1 = Gewichtsmittelwert der Hohlstanzenpapierproben aus Photo 1

St_2 = Gewichtsmittelwert der Hohlstanzenpapierproben aus Photo 2

Zu Kontrollzwecken wurden später auch verschiedene Photopapiere und zahlreiche Stanzproben untersucht. Für jeden gewählten Zeitabschnitt werden jeweils zwei gleichbehandelte Milzproben entnommen, photographiert und ausgewertet. Der Mittelwert der Flächenänderung dieser beiden Proben gilt als rechnerisches Auswertungsergebnis, das zeichnerisch in den Kurven festgehalten wird.

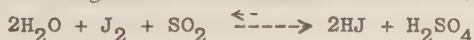
In gleicher Weise wird die Eindringtiefe des Fixiergemisches Methanol-Formol festgehalten und prozentual berechnet. Zum Abbildungsgewicht des Nativzustandes wird hier das Abbildungsgewicht der zentralen, noch nicht fixierten Gewebebereiche in Beziehung gesetzt. Dazu werden die Milzstückchen nach ihrer Entnahme parallel zu ihrer größten Ausdehnung, also auch parallel zur Photoebene halbiert und photographiert. Voraussetzung für das exakte Ausschneiden ist eine deutlich sichtbare Grenze zwischen fixierten und unfixierten Gewebebereichen. Eine solche Abgrenzung findet sich jedoch nur nach der Fixation (siehe Abb. 3), nicht mehr nach der Entwässerung und Einbettung.

Abb. 3

Querschnitt durch ein anfixiertes Milzblöckchen nach 40 min. Fixationsdauer bei 500 Torr und 4°C. Die Grenze zwischen fixiertem Gewebe und unfixiertem Zentrum ist deutlich sichtbar.

2. Chemische Auswertungsmethode

Die Einbettung organischen Materials in MMA erfordert eine möglichst vollständige Entwässerung, um eine gleichmäßige Polymerisation zu erreichen. Der qualitative und bedingt auch quantitative Nachweis der Wasserfreiheit der Proben im Bereich des Abschnittes Entwässerung wurde durch Einbringen der halbierten Milzstückchen in sorgfältig vorgetrocknete, mit 3 ml Karl-Fischers Reagens beschickte Reagenzgläser geführt. Die Milzproben wurden halbiert, um die am längsten unentwässerten Zentren dem Indikator zugänglich zu machen. Die Reaktion verläuft bei Gegenwart von Wasser nach der chemischen Formel:



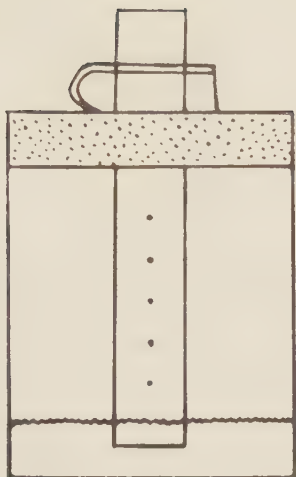
Es erfolgt ein Farbumschlag von tiefbraun zu gelb. +)
Die große Empfindlichkeit von Karl-Fischers-Reagens führte zunächst zu einem Verfahrensfehler durch die Hygroskopie des Entwässerungsmittels Methanol. Der Fehler konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß die Proben von der Einbettungsautomatik zum Wassernachweis verschlossen in mit Methanol gefüllten Gläschen transportiert und nur zum Photographieren kurz herausgenommen wurden. Das Halbieren der Proben wurde im Abzug unmittelbar vor dem Einbringen in Karl-Fischers-Reagens durchgeführt. Der quantitative Charakter der Karl-Fischer-Reaktion äußert sich auch im Zeitablauf der Farbumschlagreaktion, das heißt je weniger Wasser die Proben enthalten, desto länger wird der Zeitabstand zwischen Einbringen der Proben und Farbumschlag. Diese Zeitabstände wurden gemessen und ausgewertet. Befinden sich nur mehr Spuren von Wasser in den Proben, so ergibt sich kein vollständiger Farbumschlag mehr, sondern es entsteht im Reagenzglas an der Oberfläche des Indikators ein mehr oder minder breiter Aufhellungsdiskus. Auch diese Erscheinung wurde in die Auswertung aufgenommen. Bei völliger Wasserfreiheit der Proben konnte auch über längere Zeit keine Veränderung des Indikators festgestellt werden.

3. Modellversuch zur Prüfung des Diffusionsverhaltens der Fixierlösung.

In 6 Versuchen (Z 1 - Z 6) wurde das Wanderungsverhalten der drei Fixationsmittel

- a) Methanol-Formol gepuffert (Schaffer'sche Lösung)
 - b) Methanol
 - c) Formol auf Chromatographiepapier (Whatman Nr. 1) überprüft.
- Hierzu wurde eine einfache Versuchsanordnung verwendet: Eine Rundküvette wurde mit einem Schlitzstopfen versehen und durch diesen ein mit Zentimetermarken berzeichneter Streifen des Chromatographiepapiers Whatman Nr. 1 mit den Maßen 1,5 x 9,5 cm

+)
Für die Beratung bei der Auswahl des geeigneten Wassernachweises danke ich Herrn Prof. Nöth vom Anorganischen Chemischen Institut der Universität München sehr herzlich



eingebraucht. Eine Büroklammer am oberen Ende des Papiers ermöglichte eine exakte Eintauchtiefe von 0,5 cm des Streifens in 15 ml der zu prüfenden Flüssigkeit (siehe Skizze). Mit einer Stoppuhr wurde dann gemessen, innerhalb welcher Zeit die Marken von der aufsteigenden Flüssigkeit erreicht werden. Das Modell war klein genug, um im Probengefäß der Einbettungsautomatik Platz zu finden. So war es möglich, das Wanderungsverhalten der drei Flüssigkeiten bei Unterdruck und Kühlung zu beobachten. In einer späteren Anordnung wurden zwei ähnliche Modelle nebeneinander benutzt, als es um die Frage eines eventuellen "Vorauslaufens" des Methanol ging. Dabei wurde zur Unterscheidung der Lösungskomponenten Formol und Methanol noch Schiff'sches Reagens am Ende des Streifens aufgebracht, das mit Formol unter Rotfärbung reagiert, bei Zusammentreffen mit Methanol jedoch farblos bleibt (siehe Versuch Z_6). Für die im folgenden beschriebenen Versuche Z_1 bis Z_5 gilt, daß jeder angegebene Wert Mittelwert von drei Einzelwerten ist.

Z_1 : Im Versuch Z_1 wurden Methanol, Schaffer'sche Lösung und Formol jeweils auf ihre Wanderungsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur ($19,5^\circ\text{C}$) und Normaldruck außerhalb der Einbettungsautomatik untersucht.

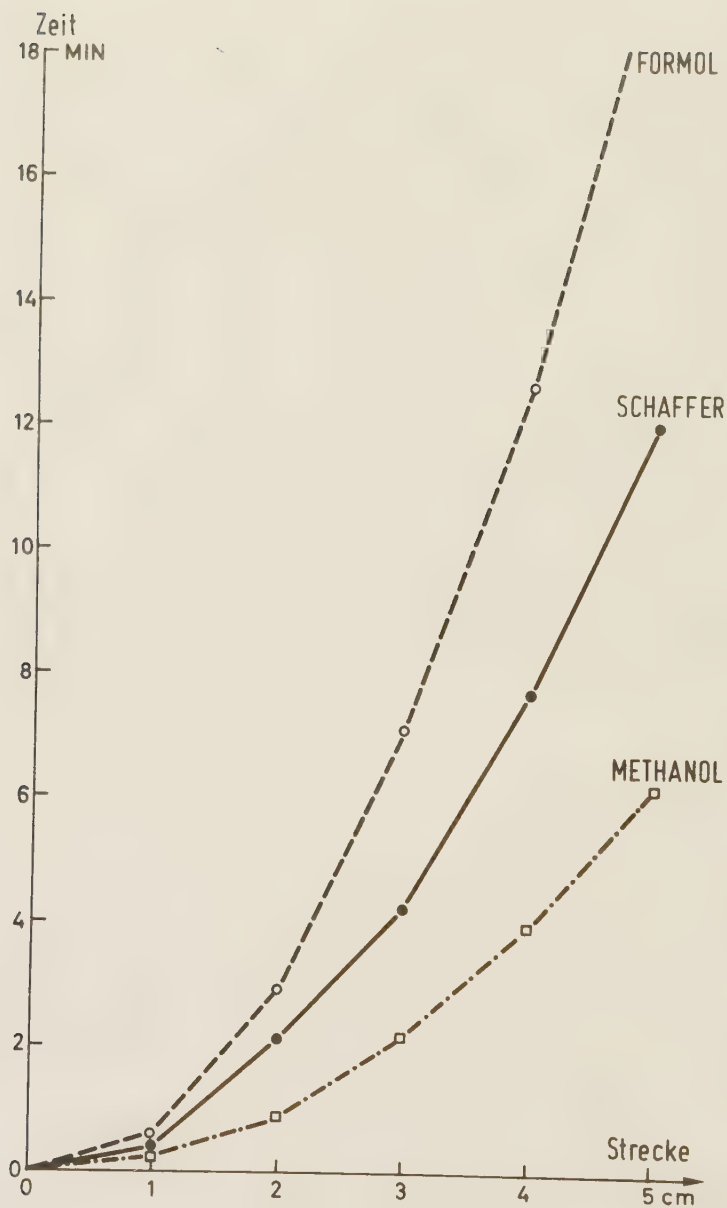


Diagramm D₁

Tabelle 1:

Steighöhe	Methanol	Formol	Schaffer
1cm	13"	37"	21"
2cm	54"	2'56"	2'08"
3cm	2'10"	7'05"	4'15"
4cm	3'59"	12'40"	7'48"
5cm	6'13"	19'20"	12'00"

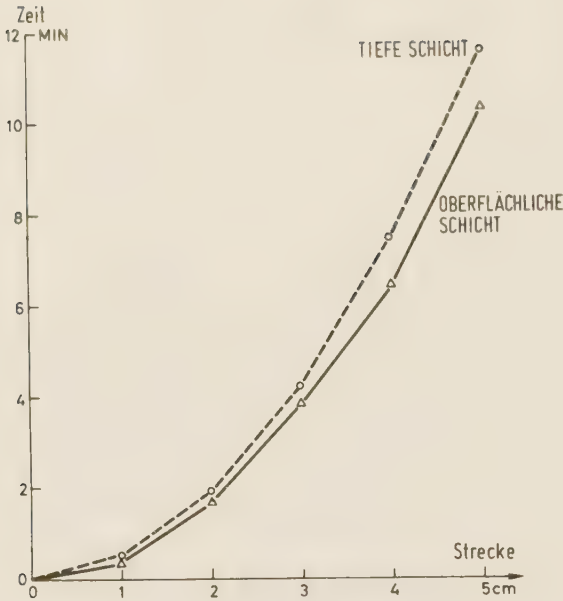
Ergebnis: (Diagramm D₁) Methanol wandert am raschesten (5 cm in 6'13"), Schaffer'sche Lösung braucht für diese Strecke 12 und Formol 20'10". Wichtig erscheint, daß das Gemisch eine "eigene" Wanderungsgeschwindigkeit besitzt, daß also nicht, wie bei einer Entmischung zu erwarten, der Methanol-anteil vorauslaufend eine Wanderungsgeschwindigkeit vor-täuscht, die der des reinen Methanol nahe käme! Diese Erscheinung einer eigenen Wanderungsgeschwindigkeit für das Gemisch wiederholte sich auch bei den folgenden Versuchen, bei denen Druck und Temperatur verändert wurden.

Z₂: Nun wurde geprüft, ob sich die verwendete Lösung etwa durch Absetzen entmischt. Aus einer 5-Literflasche gefüllt mit Schaffer - scher Lösung, die 24 Stunden nicht bewegt worden war, wurden mit einer Pipette aus der oberflächlichen Schicht und aus der Bodenschicht der Lösung jeweils 15 ml entnommen und die Wanderungsgeschwindigkeit bei 20,5°C und Normaldruck untersucht.

Tabelle 2:

Steighöhe	Schaffer oben	Schaffer unten
1cm	21"	28"
2cm	1'41"	1'56"
3cm	3'51"	4'16"
4cm	6'28"	7'25"
5cm	10'18"	11'23"

Ergebnis: (Diagr.D₂)



Der aus der oberflächlichen Schicht entnommene Anteil wandert schneller. Die Zeitdifferenz auf der 5cm-Strecke beträgt etwas über 1 Minute. Auf diese Beobachtung wurde im Versuch Z₃ eingegangen.

Diagramm D₂

Z₃: 5 Liter Schaffer'sche Lösung wurden nach gutem Durchschütteln 4 Tage lang bei Raumtemperatur (17,5 bis 20,5°C) und Normaldruck stehen gelassen. Die Wanderungsgeschwindigkeiten an der Oberfläche der Lösung wurden gleich nach Beginn des Versuches (O-Wert), nach 2 h, nach 2 Tagen und nach 4 Tagen in der beschriebenen Weise ermittelt.

Tabelle 3:

Steighöhe	O-Wert	nach 2h	nach 2 Tg	nach 4 Tg
1cm	25"	27"	27"	22"
2cm	2' 05"	2' 02"	2' 05"	2' 10"
3cm	4' 40"	4' 45"	5' 00"	4' 10"
4cm	8' 10"	8' 40"	8' 30"	7' 55"
5cm	12' 32"	13' 25"	13' 45"	11' 30"

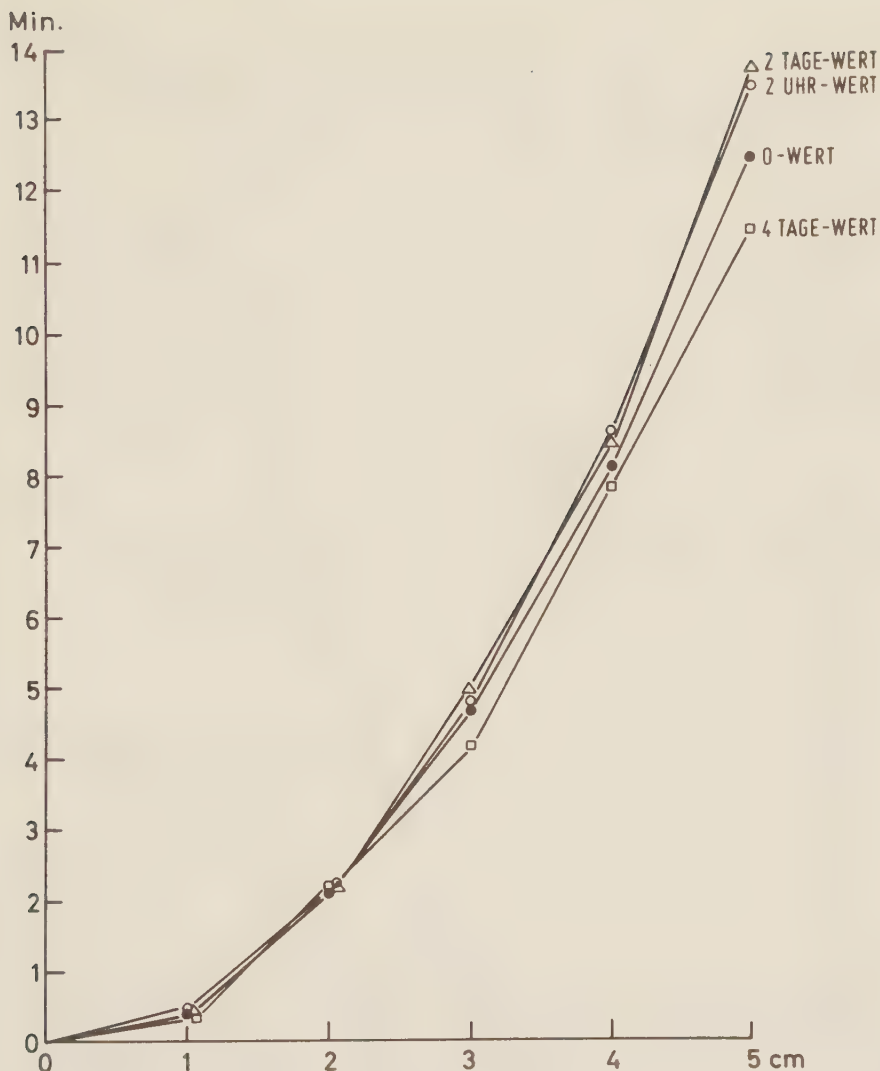


Diagramm D₃

Ergebnis: (Diagramm D₃) Die Wanderungsgeschwindigkeit ist nach 4 Tagen am größten. Da jedoch 2-Stunden- und 2-Tage-Wert eine langsamere Geschwindigkeit zeigen als der 0-Wert, dürfte die an sich geringe Divergenz der Kurven als Streuung im Normbereich gelten. Es ist also nicht zu einer Entmischung gekommen!

Z₄: Versuch Z₄ galt der Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Drucken (760, 500, 300 Torr) auf die Wanderungsgeschwindigkeiten von Methanol, Schaffer scher Lösung und Formol. Dies geschah in 9 Einzelversuchen.

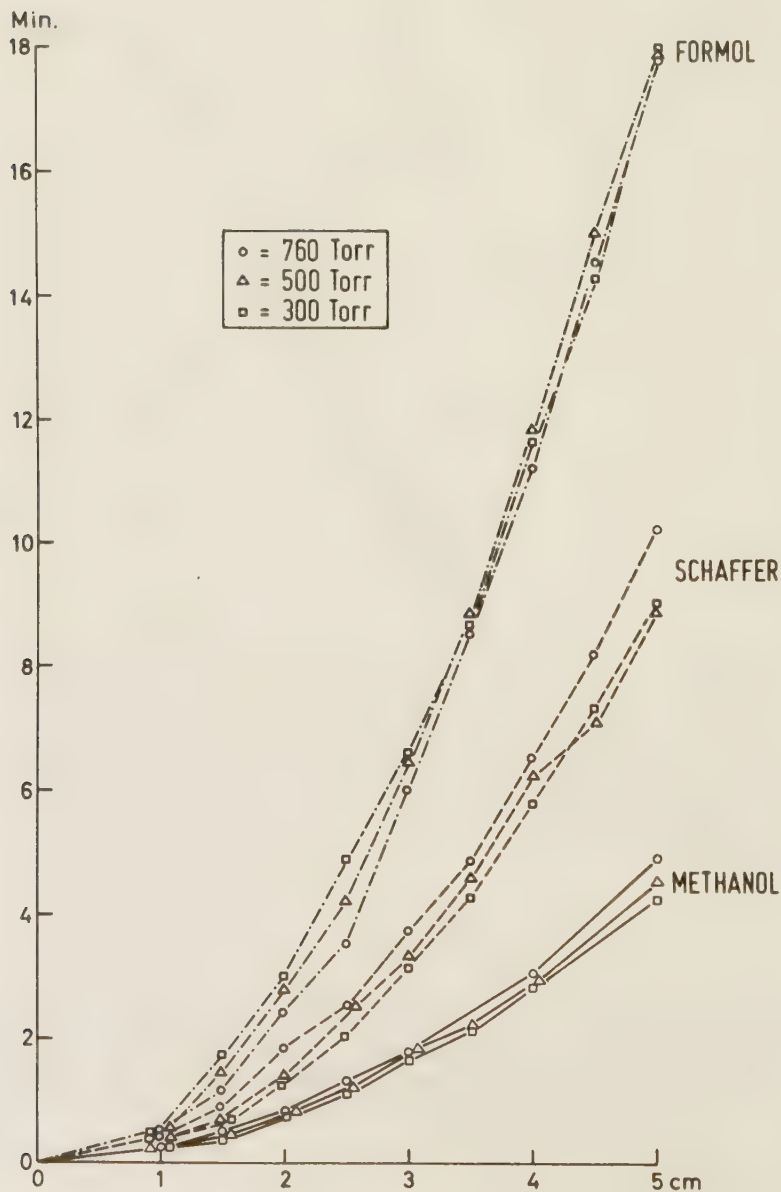


Diagramm D₄

Tabelle 4 :

Steighöhe	Methanol			Schaffer			Formol		
	76oT	5ooT	3ooT	76oT	5ooT	3ooT	76oT	5ooT	3ooT
1 cm	11"	12"	13"	22"	14"	13"	26"	35"	32"
1,5cm	27"	25"	22"	54"	37"	45"	11o"	132"	145"
2 cm	48"	48"	43"	15o"	119"	125"	225"	25o"	3o3"
2,5cm	118"	114"	1o8"	23o"	2o7"	23o"	335"	412"	455"
3 cm	146"	147"	139"	343"	31o"	318"	6oo"	628"	635"
3,5cm	-	-	-	458"	418"	437"	837"	855"	845"
4 cm	3o8"	259"	249"	634"	546"	612"	1115"	1153"	114o"
4,5cm	-	-	-	813"	72o"	7o6"	143o"	15oo"	1415"
5 cm	458"	435"	413"	1o1o"	856"	9oo"	1748"	1755"	179o"

Ergebnis: (Diagramm D₄) Änderungen des Druckes in dem angegebenen Bereich brachten keine signifikanten Änderungen der Wanderungsgeschwindigkeiten. Die Kurvenbündel zeigen einen Verlauf, der dem im Diagramm D_j ähnelt.

Z₅: Bei Versuch Z₅ wurde die Auswirkung von Temperaturunterschieden auf die Wanderungsgeschwindigkeiten der vorher geprüften Substanzen bei +6°C und bei +22°C untersucht. (Druck konst. 5oo T)

Tabelle 5 :

Steighöhe	Methanol		Schaffer		Formol	
	6°C	22°C	6°C	22°C	6°C	22°C
1 cm	18"	24"	33"	29"	11o"	54"
2 cm	112"	132"	228"	2oool	456"	3o3"
3 cm	235"	225"	536"	421"	11o5"	646"
4 cm	431"	41o"	915"	7o2"	1816"	1153"
5 cm	7o2"	65o"	133o"	1115"	2715"	18b3"

Ergebnis: (Diagramm D₅) Die Auswirkung der Temperaturänderung auf die Wanderungsgeschwindigkeiten der drei untersuchten Flüssigkeiten sind unterschiedlich: Methanol reagiert kaum auf Temperaturänderung, Schaffer'sche Lösung wandert bei Temperaturerhöhung deutlich schneller, Formol schließlich zeigt den größten Geschwindigkeitszuwachs. Zumindest im Hinblick auf den Einfluß der Temperatur auf Wanderungs- bzw. Eindringgeschwindigkeit erscheinen somit Modellversuch und Gewebefixation vergleichbar, wie sich später zeigt.

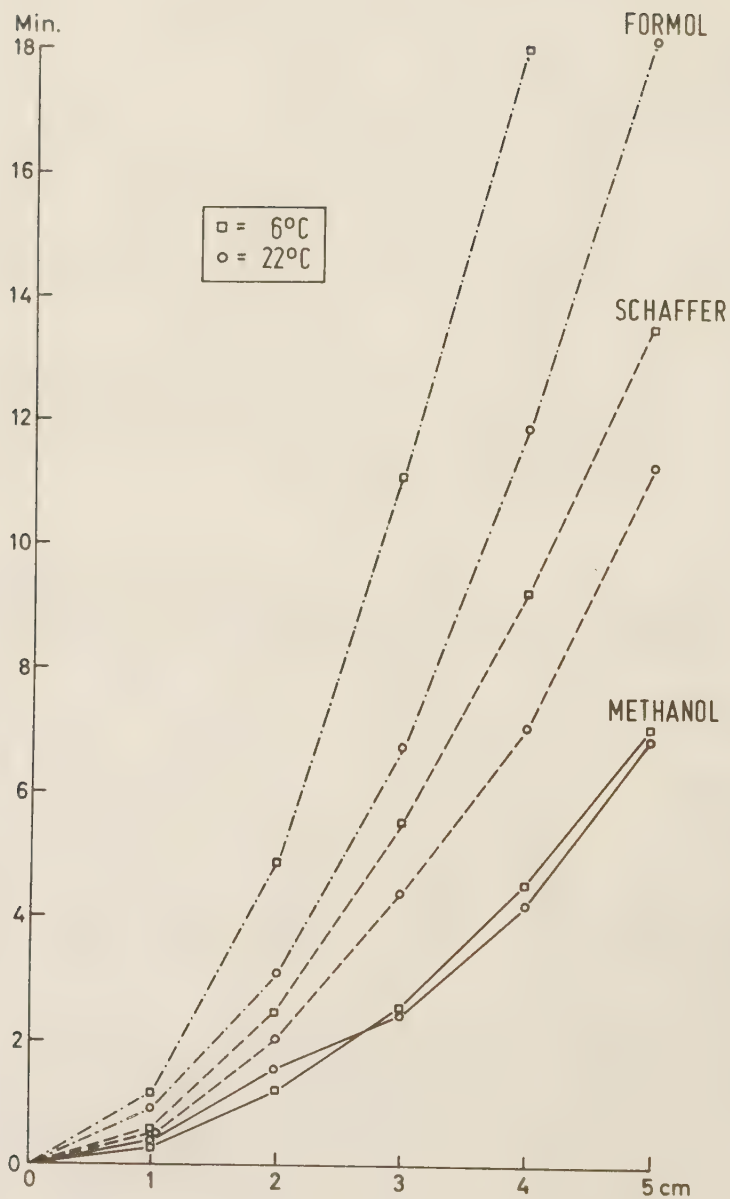


Diagramm D₅

Z_6 : In Z_6 wurde die Möglichkeit einer Entmischung der Fixiermittel während der Wanderung auf dem Chromatographiepapier untersucht. Dazu wurden zwei 200 ml fassende Erlenmeyerkolben mit jeweils 80 ml Schaffer scher Lösung (Kennzeichnung "S") bzw. Formol (Kennzeichnung "F") gefüllt und mit Schlitzstopfen luftdicht abgeschlossen. Durch die Schlitze wurden zwei Chromatographiepapierstreifen eingebracht und je 1 cm tief eingetaucht. Eine Laboruhr wurde mitphotographiert. Der Versuch wurde auf eine Stunde begrenzt. (Siehe Abb. 4). Nach 20 Minuten wurde auf jedes Papierende in gleicher Höhe ein Tropfen von Schiff schen Reagens aufgebracht, das auf Formol einen Farbumschlag nach tiefviolett zeigt. (Abb. 5) Nach 25 Minuten kommt es bei der Schaffer schen Lösung zu einem leichten sichelförmigen Farbumschlag, obwohl die aufsteigende Flüssigkeit die Indikatormarke noch nicht ganz erreicht hat. (Abb. 6). Dieselbe Erscheinung tritt im Formolgefäß erst nach weiteren 10 Minuten auf. Nach 50 Minuten sind beide Indikatormarken stark violett gefärbt (Abb. 7), nach einer Stunde schließlich ist der Farbstreifen im linken Gefäß deutlich breiter als rechts.

Ergebnis: In Z_6 konnte eine Entmischung des Fixiermittels während der Wanderung ausgeschlossen werden, Schaffer sche Lösung wanderte wiederum rascher als Formol.



Abb. 4



Abb. 5



Abb. 6

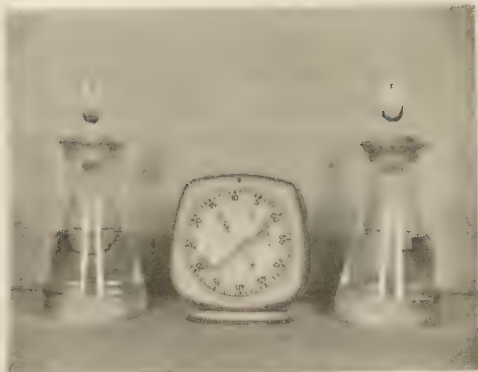


Abb. 7

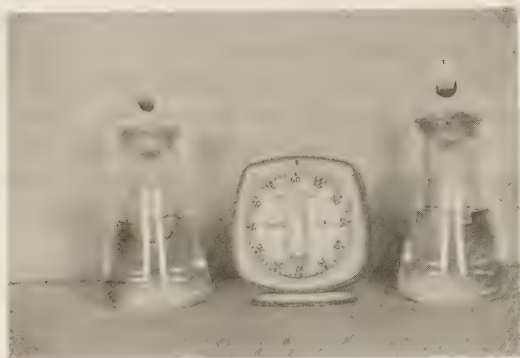


Abb. 8

Zusammenfassung der Versuche Z_1 bis Z_6 :

Im Vorgriff auf die späteren Versuche mit Milzstückchen läßt sich festhalten, daß sich in der gewählten Versuchsanordnung die Wanderungsgeschwindigkeiten von Methanol, Methanol-Formol-Gemisch und Formol ähnlich wie bei der Fixation von Milzstückchen verhalten. Auch der Einfluß von Temperaturerhöhung wirkt sich im Modellversuch ebenso aus wie am Organ. Im Modellversuch wandert Formol in methanolischer Lösung (Schaffer sche Lösung) weit schneller als reines Formol, doch weniger schnell als Methanol. Eine signifikante Entmischung des Formol-Methanolgemisches war nicht festzustellen. In einem Langversuch über 4 Tage konnte eine Entmischung - evtl. hervorgerufen durch langes Stehen - von Schaffer scher Lösung ebenso ausgeschlossen werden wie in einem photographisch festgehaltenen Indikatorversuch.

4. Mikroskopische Auswertung

Die Beurteilung nach rein chemisch-physikalischen Gesichtspunkten bedarf im Hinblick auf das gewünschte Endergebnis der Ergänzung durch die mikroskopische histologische Auswertung. Hier zeigt sich, welchen Einfluß etwa die Geschwindigkeit der Fixation, oder während der Präparation auftretende Volumenänderungen der Proben auf den Erhaltungszustand von Zellen und Geweben besitzen.

So wurden die Milzstückchen nach Beendigung der jeweiligen Auswertung wie bisher üblich im Routineverfahren weiterbehandelt. Die fertigen Präparate wurden nach Giemsa mit Gallaminblauvorbeizung gefärbt und nach folgenden Gesichtspunkten untersucht:

- a) Quellungs- oder Schrumpfungerscheinungen in den Randzonen der Präparate.
- b) Platzen, Quellung oder Schrumpfung der Erythrozyten.
- c) Veränderungen in den Grenzbereichen bei unvollständiger Fixierung.
- d) Zustand der Granulozyten (Verklumpungen in den Kernzonen).

2,3 Fehlerkontrollen der Auswertung

Im Verlauf der Untersuchungen wurden unregelmäßige Flächenänderungen auch bei gleichbehandelten Milzproben beobachtet, während die Auswertung der Eindringtiefen gleichmäßigere Ergebnisse brachte. Drei Fehlerquellen mußten in Betracht gezogen werden:

- a) Unterschiedliche und in sich ungleiche Photopapiergewichte.
- b) Ungenaueres Ausschneiden der Abbildungen.
- c) Ungleiche Gewebeschaffenheit der einzelnen Proben.

Dazu wurden drei Parallelversuche (V_{A1} bis V_{A3}) mit je 10 Proben unter gleichen Bedingungen (500 Torr, 15°C , Wechselintervall für die Fix.lsg. 20'). Die Proben wurden jeweils nach 30',

1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden entnommen und photographiert, um Flächenänderungen der Proben bzw. Eindringtiefe der Fixierlösung festzustellen. Die Negative wurden im Format 9 x 13 cm auf zwei verschiedene Photopapiere vergrößert (Agfa Rekord Rapid 1 und Agfa Brovira 1), die Auswertung erfolgte wie früher bereits beschrieben.

AGFA-REKORD-RAPID 1

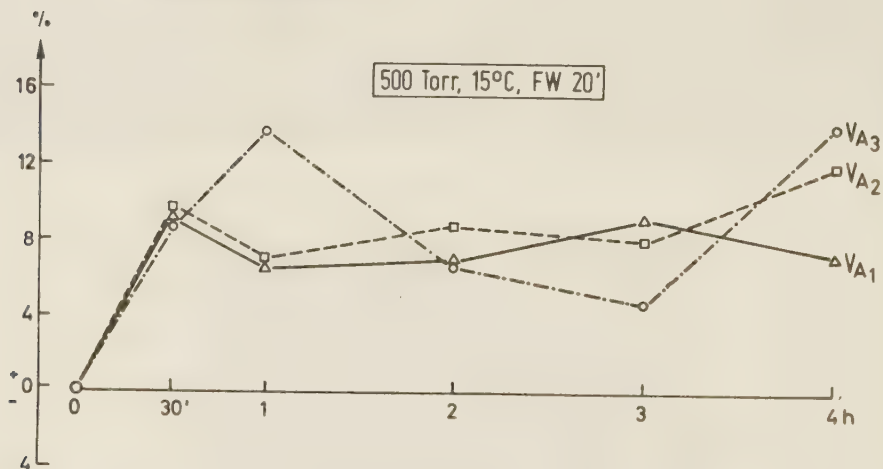


Diagramm D₆

AGFA-BROVIRA-PAPIER 1

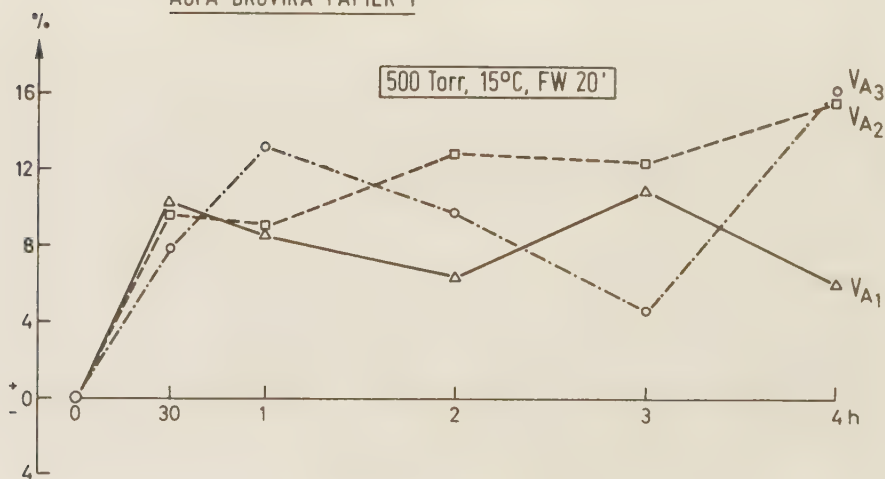


Diagramm D₇

Vergleich 1a : (Vergleich der Flächenänderungsdiagramme D_6 und D_7)

Die Versuche V_{A1} und V_{A2} ergeben sehr ähnliche Diagramme, während bei V_{A3} sich die anfängliche Quellungsrate bis zum 1-Stundenwert steigert, um später Werte anzunehmen, die im Bereich von V_{A1} und V_{A2} liegen. Der Vergleich der Photopapiere ergibt Unterschiede bei gleich abzulesenden Werten für die Flächenänderung von maximal 4,2 % (vergleiche Diagramm $D_6 - D_7$: 3-Stundenwert von V_{A2}), das arithmetische Mittel der Abweichungen liegt bei 1,9 %.

AGFA-REKORD-RAPID 1

BROVIRA I

500 Torr, 15°C, FW 20'

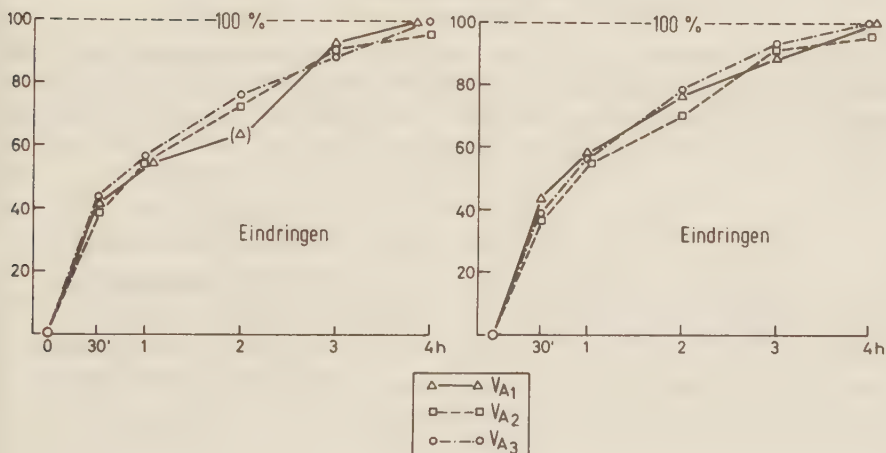


Diagramm D_8

Diagramm D_9

Vergleich 1b : (Vergleich der Eindringtiefindiagramme D_8 und D_9)

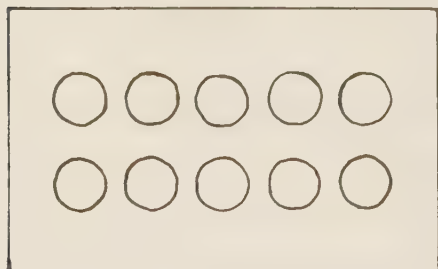
Für das Eindringen wurde eine maximale Abweichung von gleich abzulesenden Werten von 4,9 % festgestellt (3-Stundenwert von V_{A3}), das arithmetische Mittel der Abweichungen betrug 2,1 %. Zwar zeigte der 2-Stundenwert von V_{A1} für das Eindringen eine Differenz von 13,8 %, doch dürfte es sich im Hinblick auf die sonst geringen Unterschiede um einen Fehler beim Ausschneiden der Photos handeln! Dieser Wert wurde weder als Maximum angegeben, noch in die Berechnung aufgenommen.

Vergleich 1c : (Vergleich der Parallelversuche bei gleichem Papier)

Der Unterschied zwischen den Parallelversuchen mit gleichem Photopapier beträgt bei der Messung der Quellungswerte auf ARR 1 maximal 6,8 % (siehe Diagr. D₆ : Unterschied der 4-Stundenwerte zwischen V_{A1} und V_{A3}), bei der Auswertung auf Agfa Brovira 1 maximal 10,1 %.(siehe Diagr. D₇: Unterschied zwischen V_{A1} und V_{A3} bei 4 Stunden). Das arithmetische Mittel der Abweichungen beträgt bei der Quellung für ARR 1) 2,9 %, für ABr 1) 4,2 %.

Für die Messung der Eindringtiefe ergibt sich als maximale Differenz gleich abzulesender Werte für ARR 1 6,8 % (Diagr. D₈, 30-Minutenwert), für ABr 1 6,2 % (Diagr. D₉, 2-Stundenwert). Das arithmetische Mittel der Abweichungen bei der Eindringtiefe liegt für ARR 1 bei 3,2 %, für ABr 1 bei 3,4 %.

Es ist demnach wahrscheinlich, daß der Wahl des Photopapiers keine entscheidende Bedeutung zukommt; dies erhärtet auch die folgende Untersuchung: Aus 6 Photos (davon 3 ARR 1 und 3 ABr 1) wurden rasterartig (siehe Skizze) 10 Stanzen entnommen und gewogen.



V = Variationsweite

$\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel

S = Standardabweichung

$S_{\bar{x}}$ = Standardabw. in % $\bar{x}$

S_M = Mittlerer Fehler bezogen auf Standardabweichung

Tabelle 6: (g $\times$ 10⁻⁴)

						V	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	S_M
ARR 1	487	493	499	492	488	14	493,7	5,33	1,08	1,68
	498	500	495	486	499					
ARR 1	491	488	489	486	492	9	488,8	2,90	0,59	0,92
	483	489	491	487	492					
ARR 1	493	483	488	483	492	12	486,8	4,47	0,92	1,41
	485	484	493	486	481					
ABr 1	485	486	484	487	492	14	484,5	4,17	0,86	1,32
	480	480	486	478	487					
ABr 1	500	499	500	500	499	8	499,5	2,24	0,45	0,71
	500	503	502	495	497					
ABr 1	486	487	492	495	495	14	493,9	4,72	0,96	1,49
	494	493	500	500	497					

Aus Tabelle 6 läßt sich erkennen:

- a) Die Variationsweite der mit einer Analysenwaage gewonnenen Papierstanzen überschreitet nicht 14×10^{-4} Gramm
- b) Die Standardabweichung beträgt maximal $5,33 \times 10^{-4}$ g, in % des arithmetischen Mittels für diesen Wert 1,08%.
- c) Die Durchschnittswerte von Variationsweite, Standardabweichung und mittlerem Fehler unterscheiden sich kaum zwischen ARR 1 und ABr 1 .
- d) Der mittlere Fehler überschreitet nicht $1,68 \times 10^{-4}$ g.
- e) Die Verteilung der Werte zeigt, daß die Photos kein typisches Dickenrelief besitzen, wie etwa am Rande dünner, oder in der Mitte stärker. Die Unregelmäßigkeiten in der Papierdicke sind gleichmäßig verteilt.

Für die Routineauswertung bei den später folgenden Versuchen genügte es also, jeweils aus den diagonalen Ecken der entsprechenden Photos eine Stanze zu entnehmen und ihren Gewichtsmittelwert in die Berechnung mit aufzunehmen.

Vergleich 1d : (Papierdickenkorrektur, Diagramme D_{10} und D_{11})

Die Diagramme D_{10} und D_{11} veranschaulichen die Bedeutung der Papierdickenkorrektur für beide Photopapiere. Die Kurvenverläufe von D_6 und D_7 werden in zartem Strich in D_{10} bzw. D_{11} aufgenommen. Das arithmetische Mittel der Abweichungen zwischen korrigierten und unkorrigierten Funktionen beträgt 1,7 % und erreicht maximal 3 % (4-Stundenwert von V_{A2} in D_{10}).

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß die gewählte Methode der photographischen Auswertung die beobachteten Unregelmäßigkeiten nicht erklärt. Deutlich sichtbar wurden die Unterschiede in der Schwankungsbreite zwischen Quellungsdiagrammen und Eindringtiefendiagrammen: Quellungsdiagramme verlaufen wesentlich unregelmäßiger.

Im folgenden sollte das Ausschneiden der Photographien als Fehlerquelle untersucht werden. Dazu wurden aus zehn gleichen Photographien an 10 verschiedenen Tagen Probenabbildungen ausgeschnitten und gewogen, außerdem wurde die Papierdickenkorrektur durchgeführt wie bereits beschrieben. Es handelte sich bei der Abbildung um ein teilweise fixiertes Milzstückchen, die Zentren wurden ebenfalls ausgeschnitten.

AGFA-REKORD-RAPID 1

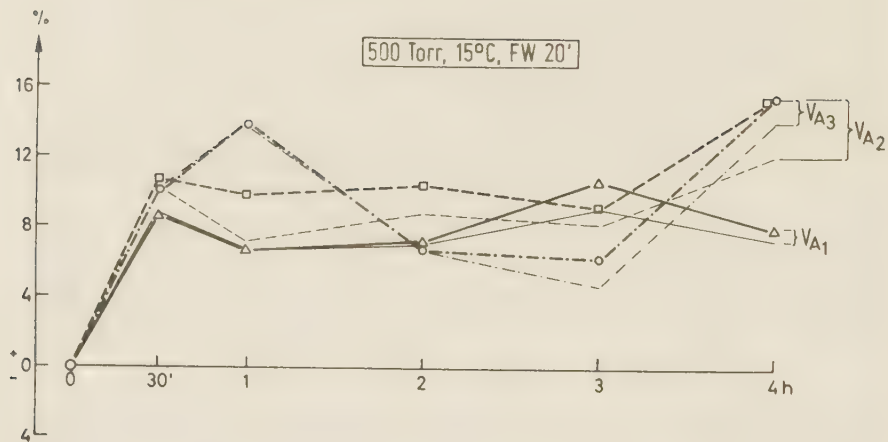


Diagramm D₁₀

AGFA-BROVIRA 1

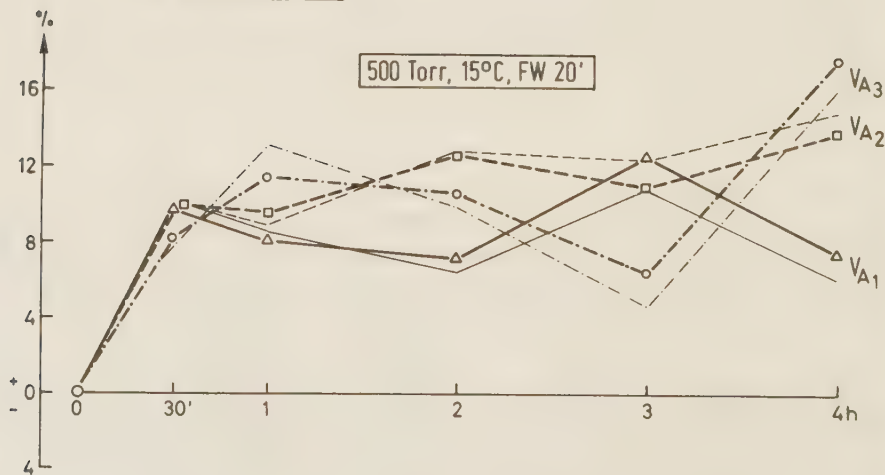


Diagramm D₁₁

Tabelle 7 : (In Gramm)

Datum	Photo	St ₁	St ₂	St _M	Abb.	Abb _Z	Photo Abb.	Abb St _M	Photo Abb _Z	AbbZ St _M	Abb Abb _Z
4.11.	2,0899	0,0486	0,0478	0,0482	0,7371	0,4169	2,8353	15,2925	5,0129	8,6493	1,7680
5.11.	2,0799	0,0469	0,0471	0,0470	0,7328	0,4238	2,8383	15,5915	4,9077	9,0170	1,7291
11.11.	2,0816	0,0466	0,0486	0,0476	0,7284	0,4045	2,8577	15,3025	5,1461	8,4979	1,8007
12.11.	2,0542	0,0459	0,0462	0,0460	0,7173	0,4179	2,8638	15,5935	4,9155	9,0848	1,7164
25.11.	2,0722	0,0457	0,0450	0,0453	0,7319	0,3968	2,8313	16,1567	5,2223	8,7594	1,8445
27.11.	2,0555	0,0470	0,0464	0,0467	0,7352	0,4322	2,7958	15,7430	4,7559	9,2548	1,7011
4.12.	2,0478	0,0470	0,0461	0,0465	0,7337	0,4129	2,7910	15,7785	4,9596	8,8796	1,7769
10.12.	2,0492	0,0477	0,0473	0,0475	0,7337	0,4135	2,7929	15,4463	4,9557	8,7053	1,7744
12.12.	2,0510	0,0489	0,0485	0,0487	0,7376	0,4273	2,7806	15,1458	4,7999	8,7741	1,7262
14.12.	2,0555	0,0470	0,0465	0,0467	0,7234	0,4072	2,8414	15,4904	5,0479	8,7195	1,7765

St ₁ = Stanze 1	V =	Variationsweite	0,0832	1,0109	0,4664	0,7569	0,1434
St ₂ = Stanze 2	$\bar{x}$ =	Arithmetisches Mittel	2,8228	15,5541	4,9724	8,8342	1,7614
St _M = Mittelwert der	S =	Standardabweichung	0,0300	0,2918	0,1432	0,2264	0,0436
Stanzen	S _x =	Standardabw. in % $\bar{x}$	1,06 %	1,88 %	2,88 %	2,56 %	2,48 %
Abb = Abbildung des	S _M =	Mittlerer Fehler	0,0095	0,0921	0,0448	0,0718	0,0138
ges. Milzstückchens		bezogen auf S					

Abb_Z = Abbildung des unfixierten Zentrums

In Tabelle 7 erscheinen die Gewichte der Photographien, der Stenzen und ihres Mittelwertes, der Abbildungen der Proben und ihrer Zentren. Zur statistischen Erfassung wurden Quotienten aus den einzelnen Größen gebildet und ausgewertet. Es ergibt sich, daß der mittlere Fehler für Quotienten etwa gleicher Größenordnung zwischen 0,0095 und 0,0448 g schwankt, bei Quotienten, in die die geringen Stanzengewichte im Nenner eingehen, liegt der mittlere Fehler naturgemäß etwas höher (zwischen 0,0718 und 0,0921 g). Vergleicht man die mittleren Fehler der Quotienten Photo/Abb. und Photo/Abb_Z (0,0095 zu 0,0448g), so zeigt sich deutlich, daß das Ausschneiden der Zentren mit einem relativ höheren Fehler behaftet ist, als das Ausschneiden der Gesamtabbildung! Im direkten Vergleich Abb/Abb_Z scheint sich dieser Fehler (0,0138 g) auszugleichen. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß für den mittleren Fehler in keinem Fall die Größenordnung von hundertstel Gramm überschritten wird!

Auch der durch das Ausschneiden hervorgerufene Fehler liegt also nicht in der Größenordnung der festgestellten Quellungsschwankungen. Dafür spricht auch, daß die Werte der Parallelversuche V_{A1} bis V_{A3} bei der Messung der Eindringtiefe weniger stark differieren, als bei der Messung der Flächenänderung, obgleich dort - wie auch aus Tabelle 7 ersichtlich - die Grenzen offenbar leichter zu erkennen und damit auch sicherer auszuschneiden sind.

Zusammenfassung der Fehlerkontrollen der Auswertung

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Abweichungen zwischen gleich behandelten Gewebeproben - am stärksten bemerkbar an verschieden großer Flächenänderung, geringer an der Verfärbung durch die eindringende Fixierlösung und kaum im mikroskopischen Bild - durch methodische Mängel nicht ausreichend zu erklären sind. Es muß deshalb an ein unterschiedliches Verhalten der Proben selbst gedacht werden, deren Struktur (besonders Blut- und Stromagehalt) örtliche Unterschiede aufweist.

a) Abschnitt Fixation

Die Versuche des Abschnittes Fixation sind in Tabellen zusammengestellt, die die Versuchsbezeichnungen mit Versuchsbedingungen (FW = Flüssigkeitswechselintervall), die Präparatbezeichnungen, die Präparationszeiten (in min.), Flächenänderung (in %), Eindringtiefe (in %) in der angegebenen Reihenfolge enthalten.

Tabelle 8 :

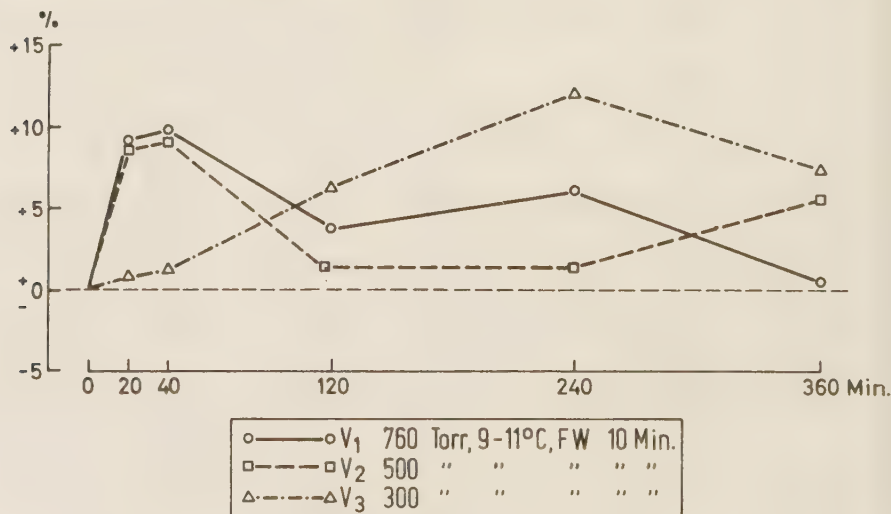
	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
V ₁ 760 T 9-11°C FW = 10'	M _{1a}	20'	+8,1	) +9,2 %	32,2	) 31,0 %
	M _{1b}		+10,2		29,7	
	M _{2a}	40'	+11,1	) +9,7 %	42,8	) 43,6 %
	M _{2b}		+8,2		44,4	
	M _{3a}	120'	-0,3	) +3,9 %	58,2	) 54,0 %
	M _{3b}		+8,1		49,7	
	M _{4a}	240'	+4,0	) +6,0 %	91,2	) 88,4 %
	M _{4b}		+8,0		85,6	
	M _{5a}	360'	+0,6	) +0,4 %	100,0	) 100,0 %
	M _{5b}		+0,2		100,0	

V ₂ 500 T 9-11°C FW = 10'	M _{6a}	20'	+6,1	) +9,1 %	28,8	) 31,4 %
	M _{6b}		+12,2		34,0	
	M _{7a}	40'	+9,1	) +9,1 %	34,5	) 36,7 %
	M _{7b}		+9,1		38,8	
	M _{8a}	120'	+7,8	) +0,6 %	56,6	) 58,5 %
	M _{8b}		-6,5		60,4	
	M _{9a}	240'	+4,1	) +1,4 %	100,0	) 100,0 %
	M _{9b}		-1,2		100,0	
	M _{10a}	360'	+6,2	) +5,7 %	100,0	) 100,0 %
	M _{10b}		+5,2		100,0	

Tabelle 8 (Fortsetzung):

	Präp.	Zeit	Flächenänderung	Eindringtiefe
V ₃ 300 Torr 9-11°C FW = 10'	M _{11a}	20'	+2,5	37,7
	M _{11b}		-0,9) +0,8 %	41,2) 39,4 %
	M _{12a}	40'	+0,3	44,9
	M _{12b}		+2,0) +1,2 %	55,3) 50,1 %
	M _{13a}	120'	+7,6	64,8
	M _{13b}		+4,8) +6,2 %	63,1) 64,0 %
	M _{14a}	240'	+8,1	100,0
	M _{14b}		+16,8) +12,5 %	100,0) 100,0 %
	M _{15a}	360'	+8,1	100,0
	M _{15b}		+6,4) +7,3 %	100,0) 100,0 %

Ergebnisse zu : V₁ : (760 Torr, 9-11°C, FW = 10')
V₂ : (500 Torr, " ")
V₃ : (300 Torr, " ")

1. Flächenänderung: (Diagramm D₁₂)Diagramm D₁₂

Die Flächen- also auch Volumenänderung stellt sich bei allen drei Versuchen als Quellungsreaktion dar, die anfangs ziemlich rasch

beginnt und sich dann mehr oder minder einpendelt; bei V_3 läuft die Quellung weniger rasch an, erreicht später aber höhere Werte als bei V_1 und V_2 .

2. Eindringen : (Diagramm D₁₃)

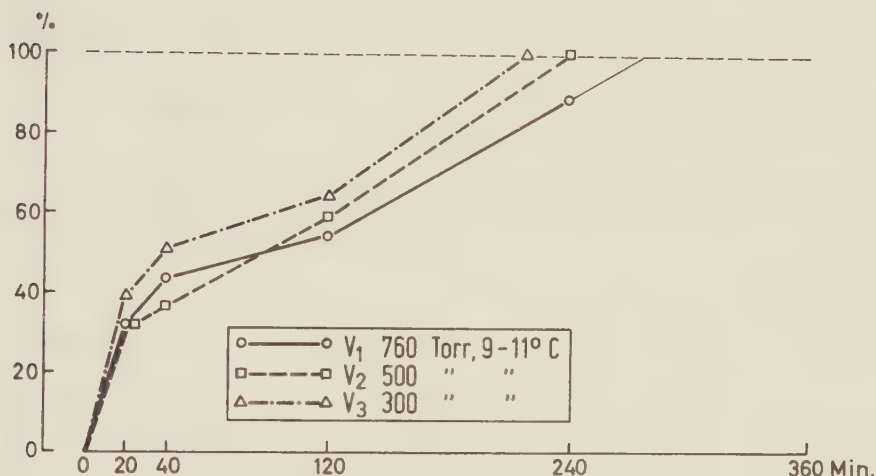


Diagramm D₁₃

Auf der Ordinate sind die fixierten Gewebeanteile in % angegeben, auf der Abszisse die Präparationszeit in Minuten. Nach dem ermittelten Kurvenverlauf dringt die Fixierlösung zunächst schnell in die Randbereiche der Proben ein und verlangsamt dann ihre Eindringgeschwindigkeit. Auf diese Erscheinung soll später noch näher eingegangen werden. Weiterhin fällt bei D₁₃ eine deutliche Abhängigkeit zwischen Unterdruck und Eindringgeschwindigkeit auf: Je größer der Unterdruck, desto rascher das Eindringen!

3. Mikroskopische Beurteilung : Bei der mikroskopischen Betrachtung der nach Giemsa gefärbten Präparate von Versuch V_1 bis V_3 fällt auf, daß die makroskopische, photographisch festgehaltene Beobachtung der gleichmäßigen Entfärbung der Milzproben noch nicht einem gleichmäßigen Erhaltungszustand der Zellen entspricht. Wie

spätere Versuche zeigen, sind hierzu bei einem Druck von 760 Torr und einer Temperatur von 9-11°C mehr als 6 Stunden erforderlich. Die makroskopisch erkennbare Farbänderung entspricht also nicht dem Zustand der mikroskopischen Fixation!

Unterdruckwerte von 300 Torr (V_3) wirken sich im Zellbild in Form von Quellen und Platzen der Erythrozyten aus, dies vor allem in den Randbereichen der Proben. Die Zentren zeigen sich besser erhalten, die Leukozyten neigen allgemein eher zur Schrumpfung. Bei 500 Torr (V_2) lassen sich die gleichen Erscheinungen in geringerem Maß feststellen. Die befriedigendsten Ergebnisse - was das Zellbild anlangt - bringt V_1 mit 760 Torr, die Zentren der Proben sind jedoch auf Grund der im Vergleich zu V_2 und V_3 geringeren Eindringgeschwindigkeit noch nicht völlig fixiert.

In den Versuchen V_4 bis V_6 wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie vorher, lediglich die Temperatur wurde auf 19-21°C erhöht.

Tabelle 9 :

	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
V_4 760 T 19-21°C FW = 10'	M _{16a} M _{16b}	20'	+12,0) +12,0)	+12,0 %	35,9) 36,6)	36,3 %
	M _{17a} M _{17b}	40'	+22,6) +17,1)	+19,8 %	40,7) 54,2)	41,5 %
	M _{18a} M _{18b}	120'	+9,7) +19,5)	+14,8 %	64,0) 59,8)	61,9 %
	M _{19a} M _{19b}	240'	+6,9) +5,2)	+6,0 %	100,0) 100,0)	100,0 %
	M _{20a} M _{20b}	360'	+12,5) +16,0)	+18,1 %	100,0) 100,0)	100,0 %
	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
V_5 500 T 19-21°C FW = 10'	M _{21a} M _{21b}	20'	+6,8) +19,8)	+13,3 %	44,8) 39,2)	42,0 %
	M _{22a} M _{22b}	40'	-2,0) +23,2)	+10,6 %	51,6) 45,3)	48,5 %
	M _{23a} M _{23b}	120'	-3,5) +14,0)	+5,2 %	71,3) 73,2)	72,2 %
	M _{24a} M _{24b}	240'	+13,1) -7,0)	+10,0 %	100,0) 100,0)	100,0 %
	M _{25a} M _{25b}	360'	+6,2) +7,1)	+6,7 %	100,0) 100,0)	100,0 %
	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Tabelle 9 (Fortsetzung)

	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
V ₆ 300 Torr 19-21°C FW = 10	M _{26a}	20'	+10,2	) +12,3 %	40,2	) 38,6 %
	M _{26b}		+14,2		37,0	
	M _{27a}	40'	+ 8,5	) +10,0 %	58,3	) 52,5 %
	M _{27b}		+11,5		46,7	
	M _{28a}	120'	+7,5	) +10,7 %	79,1	) 73,3 %
	M _{28b}		+13,8		67,5	
	M _{29a}	240'	+17,2	) +19,2 %	100,0	) 100,0 %
	M _{29b}		+21,1		100,0	
	M _{30a}	360'	+9,5	) +10,3 %	100,0	) 100,0 %
	M _{30b}		+11,0		100,0	

Ergebnisse zu : V₄ : (760 Torr, 19-21°C, FW = 10')

V₅ : (500 Torr, " ")

V₆ : (300 Torr, " ")

1. Flächenänderung: (Diagramm D₁₄)

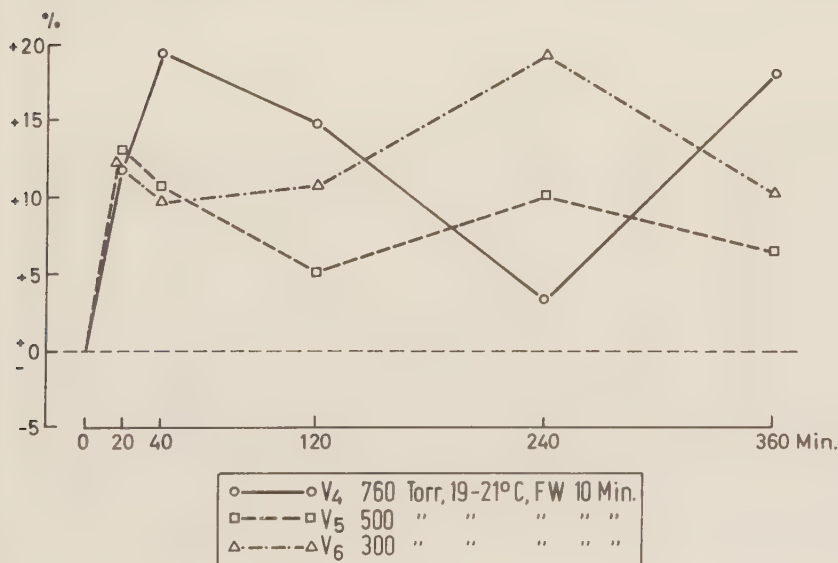


Diagramm D₁₄

Die bei der Versuchsgruppe V_4 bis V_6 gewählte Temperatur von 19 bis 21°C verursacht eine stärkere Quellungsreaktion, als dies bei V_1 bis V_3 zu beobachten war, es werden Werte bis zu +20 % erreicht.

2. Eindringen : (Diagramm D₁₅)

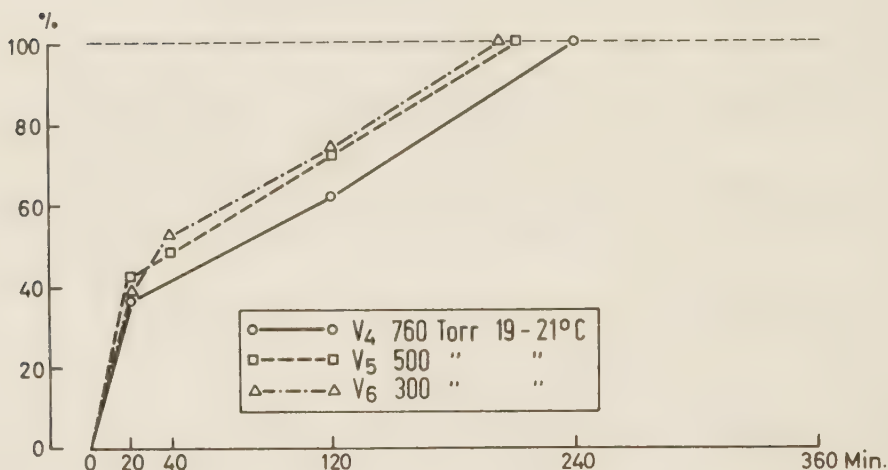


Diagramm D₁₅

Raumtemperatur begünstigt das Eindringen, bei V_4 etwa, dem Parallelversuch von V_1 ist makroskopisch bereits nach 240 Minuten eine völlige Entfärbung erreicht. Das verbesserte Eindringen gegenüber V_1 bis V_3 zeigt sich allerdings erst nach 120 Minuten; bis dahin sind die Kurvenverläufe von $V_1 - V_3$ und $V_4 - V_6$ sehr ähnlich.

3. Mikroskopische Beurteilung: Die makroskopisch feststellbare stärkere Quellung äußert sich auch im mikroskopischen Bild, die Verquellungen in den Randbereichen der Proben sind stark ausgeprägt. Eine Zeitdifferenz zwischen makroskopisch festgehaltener und mikroskopisch bestätigter völliger Fixation ist bei den Versuchen $V_4 - V_6$ nicht festzustellen, die Proben sind nach 240 Minuten durchfixiert.

Zusammenfassung von V₁ bis V₆ :

Es zeigt sich, daß vor allem Unterdruck, in geringerem Maße auch Temperaturerhöhung das Eindringen der Fixierlösung beschleunigt. Daraus entstehende Möglichkeiten für eine eventuelle Verfahrensverkürzung können jedoch wegen der dabei auftretenden Zell- und Gewebeveränderungen nicht genützt werden. Das histologische Ergebnis von V₁ (760 Torr, 9-11°C, FW 10') war am günstigsten, die Fixationszeit von 6 Stunden allerdings nicht ausreichend. Die Fixierlösung dringt offenbar zunächst rasch ein, verlangsamt ihr Vordringen aber bei zunehmender Eindringtiefe.

Die Beobachtungen bei der mikroskopischen Auswertung der Versuche V₁ bis V₆ (Zellschrumpfung bei den Leukozyten, Quellung und Platzen von Erythrozyten) führten zu den Versuchen V₇ bis V₉ und zu einer Reihe von Zusatzversuchen, die bereits beschrieben wurden (Z₁ - Z₆). V₇ bis V₉ und die genannten Zusatzversuche sollten klären, ob es unter unseren Bedingungen bei Formol-Methanol zu einer Entmischung kommen könne, auch sollte durch isolierte Fixation mit Methanol bzw. Formol untersucht werden, ob auftretende Zellschädigungen eindeutig einem bestimmten Bestandteil der Fixierlösung Methanol-Formol zuzuordnen seien.

Tabelle 10 :

	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
V ₇	M _{31a} M _{31b}	20'	-1,3 +6,5	) +2,6 %	40,3 35,3	) 37,8 %
500 T 12°C	M _{32a} M _{32b}	40'	+7,4 +13,2	) +10,3 %	49,2 45,7	) 47,4 %
FW = 10'	M _{33a} M _{33b}	120'	+4,2 +9,3	) +6,7 %	68,3 70,6	) 69,5 %
Formol- Methanol	M _{34a} M _{34b}	210'	+5,2 +13,3	) +9,2 %	76,0 71,8	) 73,9 %
	M _{35a} M _{35b}	270'	-1,8 +9,9	) +4,1 %	100,0 100,0	) 100,0 %
- - - - -						
V ₈	M _{36a} M _{36b}	20'	+4,7 +7,1	) +5,7 %	40,3 44,2	) 42,2 %

Tabelle 1o (Fortsetzung):

V ₈	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
500 T 12°C FW = 10' Methanol	M _{37a}	40'	-2,2	)	53,3	)
	M _{37b}		+2,0		56,2	
	M _{38a}	120'	-4,2	)	78,6	)
	M _{38b}		+5,1		85,5	
	M _{39a}	210'	+24,1	)	100,0	)
	M _{39b}		-5,0		100,0	
	M _{40a}	270'	+14,5	)	100,0	)
	M _{40b}		+1,6		100,0	
- - - - -						
V ₉ 500 T 12°C FW = 10' Formol	M _{41a}	20'	-2,4	)	29,6	)
	M _{41b}		-2,0		26,2	
	M _{42a}	40'	-1,0	)	37,0	)
	M _{42b}		+0,5		33,2	
	M _{43a}	120'	-7,5	)	41,0	)
	M _{43b}		+1,0		58,7	
	M _{44a}	210'	+8,0	)	70,3	)
	M _{44b}		-0,0		72,8	
M _{45a}	270'	+3,5	)	74,9	)	
M _{45b}		-13,7		80,9		
- - - - -						

Ergebnisse zu : V₇ : (500 T, 12°C, FW = 1o', Formol-Meth.)
V₈ : (" " " , Methanol)
V₉ : (" " " ; Formol)

1. Flächenänderung: (Diagramm D₁₆)

V₇ zeigt die größten anfänglichen Quellungswerte, nach einer Dauer von 3 Stunden wird der Anfangswert wieder erreicht; damit gleicht V₇ dem Verlauf von V₂ in Diagramm D₁₂. Beim folgenden Versuch V₈ sind die Proben zunächst einer kurzen Quellung unterworfen, von 4o bis 12o Minuten wird das Ausgangsvolumen gehalten, daran schließt sich wieder eine deutliche Quellungsphase. V₉, als reine Formolfixierung, bringt eine allgemeine Schrumpfung der Proben, bei 27o Minuten wird ein Wert von -10,2 % erreicht. Es darf beim Vergleich der Flächen-

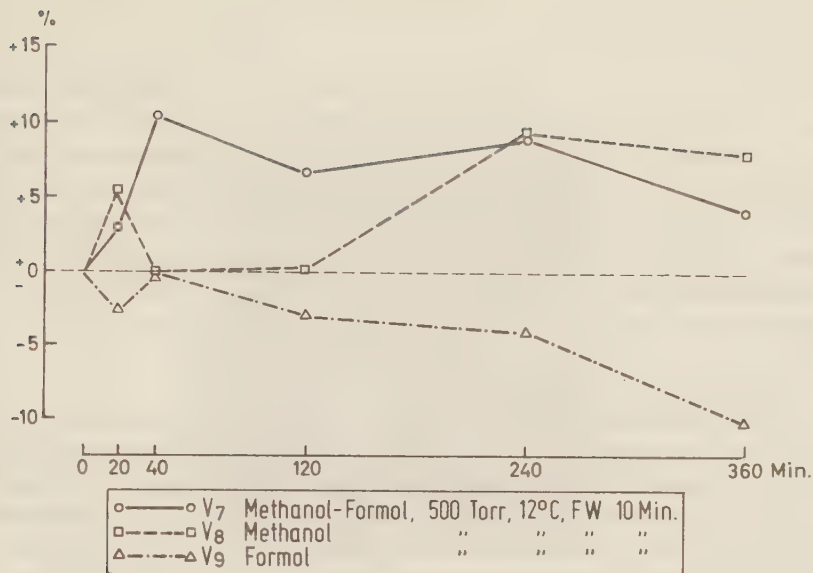
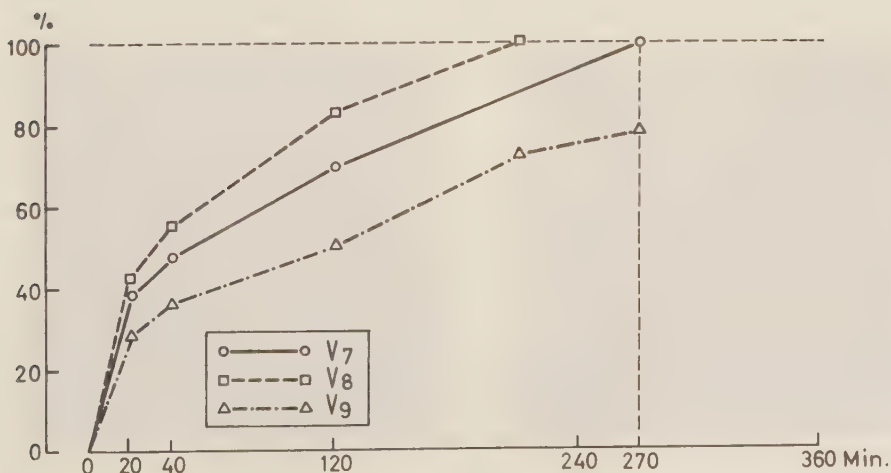


Diagramm D₁₆

Änderungen nicht übersehen werden, daß, wie das folgende Diagramm D₁₇ zeigt, nicht alle Proben zum gleichen Zeitpunkt gleich tief fixiert sind. Dies gilt vor allem für V₉, die fortschreitende Schrumpfung dabei ist jedoch unverkennbar!

2. Eindringen: (Diagramm D₁₇)



D₁₇ zeigt, daß die Eindringgeschwindigkeiten der drei geprüften Fixationsmittel sich deutlich unterscheiden: Methanol dringt am raschesten ein, eine völlige Durchdringung ist bereits nach 210 Minuten erreicht. Methanol-Formol ist deutlich langsamer, reines Formol am langsamsten. Nach Abschluß des Versuches V₉ waren die Proben lediglich zu 77,9 % verfärbt. Analog zu den Zusatzversuchen Z₁ bis Z₆ traten auch in organischem Gewebe für jedes der drei Fixiermittel eigene Wanderungsgeschwindigkeiten auf und zwar in der gleichen Reihenfolge!

3. Mikroskopische Beurteilung:

In den Abbildungen 9, 10, 11 sind die mikroskopischen Bilder der drei Fixierungen gegenübergestellt. Es handelt sich um Proben, die jeweils nach 120 Minuten entnommen wurden mit den Bezeichnungen M_{33a} (Abb.9 = Methanol-Formol-Fixierung), M_{38a} (Abb.10 = Methanol-Fixierung) und M_{43a} (Formol-Fixierung = Abb 11). Bei M_{33a} sind die zellulären Strukturen am wenigsten verändert, M_{38a} steht im Zeichen einer Zellschrumpfung, die Membranen sind dabei erhalten, die durch die Schrumpfung entstandenen Zwischenräume sind gut zu erkennen. M_{43a} schließlich bietet ein verwaschenes Zellbild mit Zelldeformationen- und zerstörungen. Die Zellmembranen sind zum Teil durchbrochen, Plasma und Kernanteile extrazellulär gelagert.

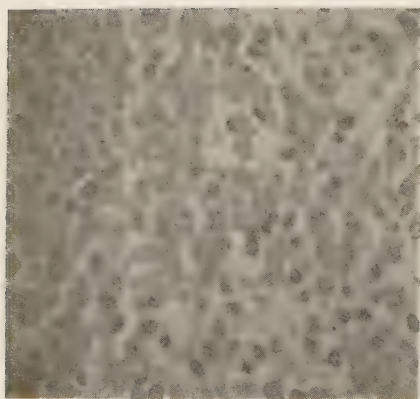


Abb. 9

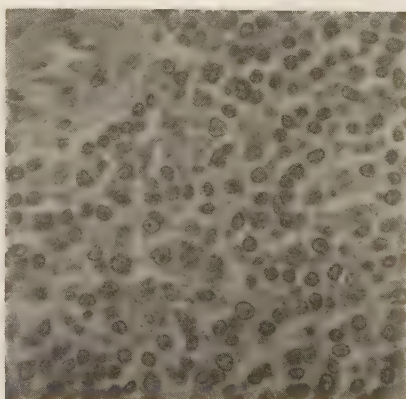


Abb. 10

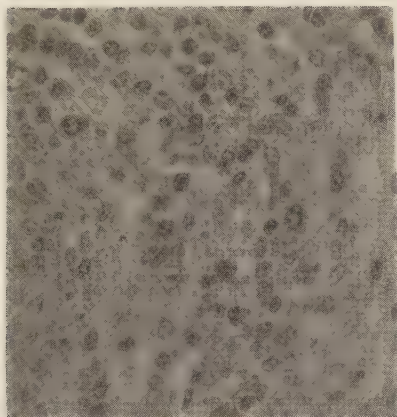


Abb. 11

Zusammenfassung von V_7 bis V_9 :

Vergleicht man die drei untersuchten Fixiermittel hinsichtlich Volumenänderung, Eindringgeschwindigkeit und Zellbild, so schneidet gepuffertes Methanol-Formol am besten ab. Die Zellschrumpfungen bei reinem Methanol, die Zellzerstörungen bei reinem Formol sind im mikroskopischen Bild deutlich geworden, wobei sich makroskopisch die Zellzerstörungen bei Formol stärker als allgemeine Schrumpfung manifestieren. Die Ausbildung von Zellzwischenräumen (M_{38a}) bei Methanol-Fixierung verhindert dort wohl eine deutlichere Volumenabnahme.

Bei den folgenden Versuchen sollte eine Unterscheidung von "durchfixierten" Gewebezonen und ungenügend, später mit Methanol im Rahmen der Entwässerung nachfixierten Bereichen möglich werden. Deshalb wurden bei den Versuchen GM_1 bis GM_4 die größer gewählten Milzproben (20 x 20 x 8 mm) nur zwei Stunden anfixiert. Dabei sollten zudem die Ergebnisse von $V_1 + V_2$ und $V_4 + V_5$ bestätigt werden; auf die 300-Torr-Variante wurde wegen ihrer bereits erwiesenen Unbrauchbarkeit verzichtet, es galten die bisher als positiv ermittelten Bedingungen : 760 Torr, 6-8°C, FW = 10'.

Tabelle 11 :

	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Eindringtiefe	
GM ₁ , 760 Torr, 6°C, FW=10'	GM _{1a} GM _{1b}	120'	+4,8 -4,0	) +0,4 %	50,8 52,0	) 51,4 %

GM ₂ , 500 Torr, 6°C, FW=10'	GM _{2a} GM _{2b}	120'	+11,8 +9,2	) +10,5 %	56,8 54,8	) 55,8 %

GM ₃ , 760 Torr, 22°C, FW=10'	GM _{3a} GM _{3b}	120'	+9,5 +4,8	) +7,2 %	62,9 58,9	) 60,9 %

GM ₄ , 500 Torr, 22°C, FW=10'	GM _{4a} GM _{4b}	120'	+10,0 +14,9	) +12,5 %	68,5 70,3	) 69,4 %

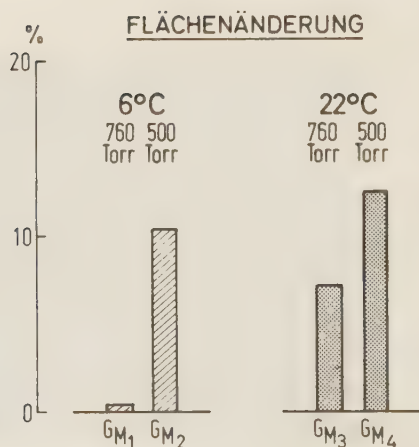
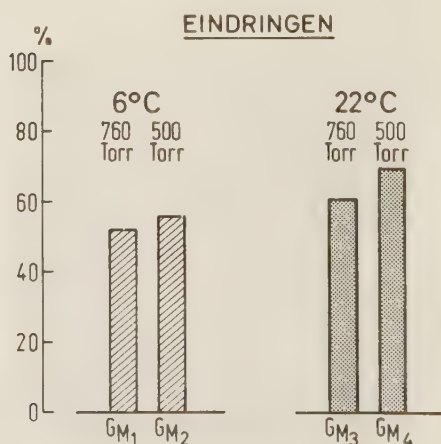
Ergebnisse zu :

GM₁ : (760 Torr, 6°C, FW = 10')

GM₂ : (500 Torr, 6°C, FW = 10')

GM₃ : (760 Torr, 22°C, FW = 10')

GM₄ : (500 Torr, 22°C, FW = 10')

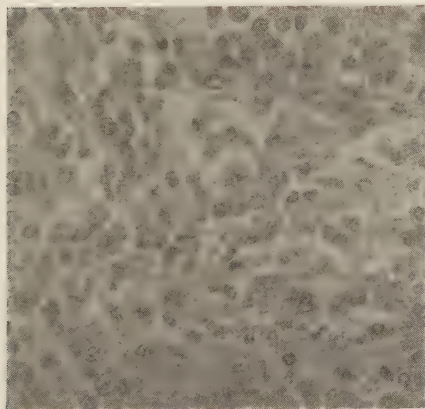
Diagramm D₁₈Diagramm D₁₉

Die Präparationszeit betrug für alle Proben 120 Minuten. Da sich aus dem Vergleich von lediglich zwei Werten (Nativzustand und nach 120 Minuten) kein Verlauf ablesen läßt, wurde ein Säulendiagramm für die zeichnerische Darstellung der Ergebnisse gewählt.

1. Flächenänderung + Eindringen : (Diagramm D₁₈ + D₁₉)

Die Unterschiedlichen Auswirkungen von Normaldruck (760 Torr) und Unterdruck (500 Torr) bzw. Kühlung (6°C) und Raumtemperatur (22°C) sind erneut gut zu erkennen: Unterdruck führt zu stärkerer Quellung und rascherem Eindringen, Kühlung bringt geringere Quellungsraten, aber auch verlangsamtes Eindringen.

2. Mikroskopische Beurteilung : Die Qualität der Fixierung läßt sich nur in den Randbereichen der Proben bestimmen, GM₁ erweist sich als am besten (siehe Abb. 12). Dies deckt sich mit den bisherigen



Ergebnissen. Die Übergänge zwischen methanol-formol-fixierten Randbezirken und methanol-fixierten Zentren sind fließend, gültige Aussagen über Quellungs- bzw. Schrumpfungsverhalten von Zellen lassen sich in diesem Bereich nicht machen. Die Zentren zeigen jedoch das für die Methanol-Fixierung typische Bild mit genereller Zellschrumpfung und Ausbildung interzellulärer Zwischenräume (siehe auch Abb. 10).

Abb. 12

Zusammenfassung von GM₁ bis GM₄

Vier Kurzversuche über zwei Stunden mit größeren Milzproben brachten eine Bestätigung der früheren Beobachtungen. Im Grenzbereich zwischen methanol-formol-fixiertem und methanol-fixiertem Gewebe finden sich fließende Übergänge, die Zentren weisen die Zeichen einer reinen Methanolfixierung auf. Unter einem Druck von 760 Torr und Kühlung von +6°C wird das beste histologische Resultat erreicht.

Bei den nächsten drei Versuchen sollte die Auswirkung von Flüssigkeitswechselintervallen auf die Fixierung geprüft werden. Es wurde von 760 Torr und einer Temperatur von 6-8°C ausgegangen. Von Interesse war vor allem ein eventuell beschleunigtes Eindringen bei rascherem Flüssigkeitswechsel und das daraus sich ergebende histologische Bild. Auf ein Festhalten der Flächenänderung wurde daher verzichtet.

Tabelle 12

	Präp.	Zeit	Eindringtiefe	
V _{S1} 760 Torr 6°C FW = 5 min.	S _{1a}	20'	30,8	) 25,6 %
	S _{1b}		20,4	
	S _{2a}	40'	42,0	) 44,0 %
	S _{2b}		46,0	
	S _{3a}	120'	59,4	) 62,0 %
	S _{3b}		64,5	
	S _{4a}	240'	74,7	) 77,6 %
	S _{4b}		80,6	
	S _{5a}	360'	92,0	) 92,2 %
	S _{5b}		92,5	

V _{S2} 760 Torr 6°C FW = 10 min.	S _{6a}	20'	38,4	) 34,4 %
	S _{6b}		30,5	
	S _{7a}	40'	47,0	) 46,6 %
	S _{7b}		46,2	
	S _{8a}	120'	57,2	) 56,5 %
	S _{8b}		55,8	
	S _{9a}	240'	85,7	) 86,6 %
	S _{9b}		87,5	
	S _{10a}	360'	91,8	) 91,0 %
	S _{10b}		90,3	

V _{S3} 760 Torr 6°C FW = 20 min.	S _{11a}	20'	39,2	) 41,5 %
	S _{11b}		43,7	
	S _{12a}	40'	42,0	) 44,3 %
	S _{12b}		46,6	
	S _{13a}	120'	71,7	) 66,6 %
	S _{13b}		61,4	
	S _{14a}	240'	81,4	) 79,9 %
	S _{14b}		78,3	
	S _{15a}	360'	93,9	) 93,0 %
	S _{15b}		92,1	

Ergebnisse zu : V_{S1} : (76o T, FW = 5 min., 6°C)
 V_{S2} : (76o T, FW = 1o " , 6°C)
 V_{S3} : (76o T, FW = 2o " , 6°C)

1. Eindringen : (Diagramm D₂₀)

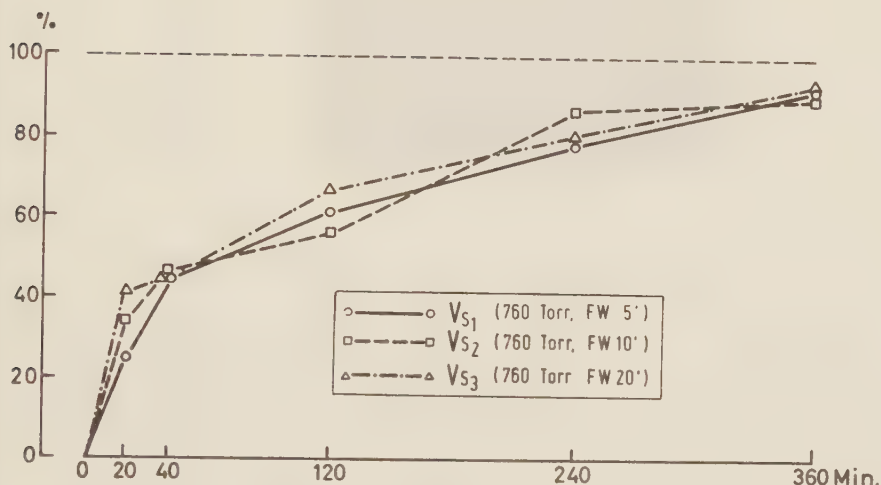


Diagramm D₂₀

Im gewählten Änderungsbereich der Flüssigkeitswechselintervalle zwischen 5 und 20 Minuten konnten keine wesentlichen Unterschiede im Eindringverhalten festgestellt werden. Zu Beginn der Versuche scheint es, als begünstige ein langsamerer Wechsel das Eindringen. Der weitere Verlauf der Kurven (40' bis 360') bestätigt diese Annahme nicht. Weiterhin wird bei den drei Versuchen deutlich, daß, unabhängig von den Flüssigkeitswechselintervallen, 360 Minuten als Fixationszeit nicht ausreichen.

2. Mikroskopische Beurteilung : Im Versuch V_{S1} (FW = 5 min.) zeigen sich an den Rändern vermehrt gequollene und geplatzte Erythrozyten, V_{S2} und V_{S3} sind gut und gleichwertig (siehe Abb. 13 = S_{15a} aus V_{S3}). Bei allen drei Versuchen zeigt sich auch mikroskopisch, was schon vom makroskopischen Bild her zu erwarten war: Die Zentren der Proben sind nicht durchfixiert!

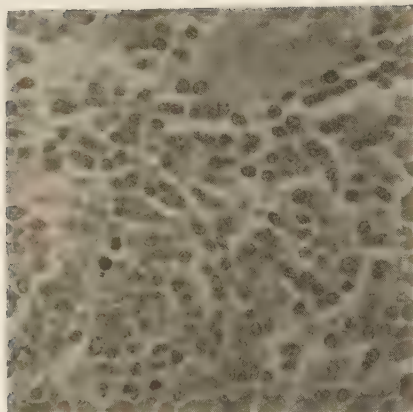


Abb. 13

Zusammenfassung von V_{S1} bis V_{S3} :

Ein Variieren der Flüssigkeitswechselintervalle hat auf die Eindringgeschwindigkeit im Abschnitt Fixation keine signifikanten Auswirkungen. Im mikroskopischen Bild sind V_{S2} und V_{S3} gut und gleichwertig. Aus Programmierungsgründen wurde für den weiteren Verlauf der Versuche für den Abschnitt Fixation ein Flüssigkeitswechselintervall von 28 Minuten bei einer Gesamtfixationsdauer von 7 Stunden gewählt. Zwei weitere Versuche unter diesen Bedingungen brachten nun gleich gute Ergebnisse bei vollständiger Fixierung der Probenzentren.

In Anbetracht der verhältnismäßig großen Flächenschwankungen sollte in zwei längeren Versuchen, bei denen die Fixationsdauer zunächst auf 11 Stunden ($\bar{U}_{F1}$) und dann auf 21 Stunden ($\bar{U}_{F2}$) ausgedehnt wurde, geprüft werden, ob sich nach Abschluß der Fixation ein Gleichgewicht der Flächenschwankungen ergäbe. Zum Vergleich dazu wurden die Flächenschwankungen der Milzstückchen im Polymerisat nach Abschluß der Gesamteinbettung durch wiederum maßstäbliches Photographieren festgehalten.

Tabelle 13 :

	Präp.	Zeit	Flächenänderung n.		Flächenänderung n.	
			Abschluß	Fixation	Gesamteinbettung	
Ü _{F1} 76o T 4-6°C FW=28'	Ü _{1a} Ü _{1b}	3h	+5,9 +5,0	) +5,4 %	+23,0 +19,4	) +21,2 %
	Ü _{2a} Ü _{2b}	5h	+4,5 +3,1	) +3,8 %	+17,2 +13,4	) +15,3 %
	Ü _{3a} Ü _{3b}	7h	+1,3 +1,9	) +1,6 %	+10,6 +13,0	) +11,8 %
	Ü _{4a} Ü _{4b}	9h	+2,8 +2,0	) +2,4 %	+12,2 + 9,7	) +10,9 %
	Ü _{5a} Ü _{5b}	11h	+0,2 +1,4	) +0,8 %	+9,4 +10,0	) + 9,7 %

Ü _{F2} 76o T 4-6°C FW=28'	Ü _{6a} Ü _{6b}	13h	+3,1 +4,1	) +3,6 %	+9,9 +11,1	) +10,5 %
	Ü _{7a} Ü _{7b}	15h	+3,5 +3,9	) +3,7 %	+ 8,4 +10,2	) + 9,3 %
	Ü _{8a} Ü _{8b}	17h	+3,2 +1,8	) +2,5 %	+11,3 + 9,9	) +10,6 %
	Ü _{9a} Ü _{9b}	19h	+4,5 +3,3	) +3,9 %	+11,9 +10,1	) +11,0 %
	Ü _{10a} Ü _{10b}	21h	+4,0 +4,2	) +4,1 %	+10,5 + 9,7	) +10,1 %

Ergebnisse zu : Ü_{F1} + Ü_{F2} : (76o T, 4-6°C, FW=28)

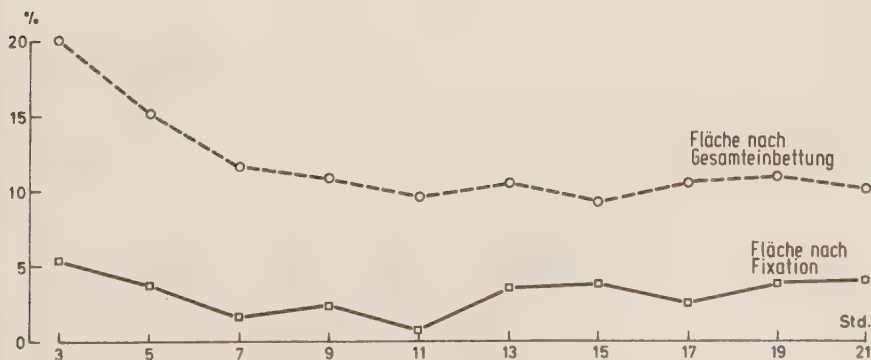


Diagramm D 21

1. Flächenänderung: (Diagramm D₂₁)

Es zeigt sich, daß Quellungsreaktionen im Verlauf der Polymerisation vor Ablauf einer vollständigen Fixierung, also etwa bis zu 7 Stunden deutlich verstärkt auftreten. Bei einer Ausdehnung der Fixation auf 21 Stunden halten sich die Quellungsraten bei einem ziemlich konstanten Mittelwert von +2,8 % bzw. +10,5 % (von 7 bis 21 Stunden).

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnittes "Fixation" :

- 1) Die Zellen der untersuchten Milzproben verändern sich während der histologischen Fixierung unvorteilhaft unter dem Einfluß von Unterdruck und Raumtemperatur.
- 2) Unterdruck und Raumtemperatur begünstigen das rasche Eindringen der Fixierlösung, der zeitliche Vorteil kann jedoch wegen der unter 1) genannten negativen Auswirkungen nicht genützt werden.
- 3) Auch unter Kühlung und bei Normaldruck kommt es bei der Fixierung mit Methanol-Formol zu einer deutlichen Quellung der Proben insgesamt, wahrscheinlich durch ungleiche Flüssigkeitsaufnahme in den Zellen.
- 4) Änderung der Flüssigkeitswechselintervalle (FW) hat in dem untersuchten Bereich keine wesentlichen Auswirkungen auf die Proben; 5-Minutenwechsel führten zu stärkeren Veränderungen in den Probenrändern.
- 5) Methanol-Formol-Gemisch erhält die Zellen weit besser als seine einzelnen Anteile. Das Eindringen von Formol ins Gewebe wird durch Methanol erheblich beschleunigt. Eine Entmischung der Komponenten bei diesem Vorgang ist nicht nachweisbar.
- 6) Das mikroskopische Resultat der Fixierung durch Methanol-Formolgemisch ist bei Atmosphärendruck und mäßiger Unterkühlung am besten. Die dadurch erforderliche Verlängerung der Fixierungsdauer hat keinen deutlich ungünstigen Effekt auf die später fixierten zentralen Gewebeabschnitte. Mäßige Volumenzunahme des fixierten Organs beeinflußt das mikroskopische Resultat nicht direkt.
- 7) Ein Vergleich der Quellungsraten nach der Fixierung und nach Abschluß der Gesamteinbettung zeigt verstärkte Quellung der polymerisierten Proben bei vorangegangener unvollständiger Fixierung.
- 8) Als geeignete Fixationsbedingungen für die Fortsetzung der Versuche erscheinen: 760 Torr, 4-6°C, FW = 28 min., Zeit: 7 Std.

b) Abschnitt Entwässerung

Der Abschnitt Entwässerung gliedert sich, dem Programm der Automatik folgend, in Entwässern I (= Tropfzeit) und Entwässern II. (siehe Methodik S. 13)

Entwässern I : Die Tropfzeit wurde bei allen Versuchen konstant so gewählt, daß über das Tropfventil im Verlauf von 30 Minuten eine Probengefäßfüllung (70 ml) von Schaffer scher Lösung gegen reines Methanol ausgetauscht wurde.

Entwässern II: Verfahren siehe S. 15/16.

Die Versuche sollten zeigen, welche Bedingungen für die Entwässerung der Milzproben am günstigsten sind.

Tabelle 14:

	Präp.	Zeit	Flächenänderung	Zeit bis zum völligen Farbumschl. d. Indik.
E ₁ 760 T 4-6°C FW=20'	E _{1a} E _{1b}	60'	-0,8 +7,8) +3,5 %	5
	E _{2a} E _{2b}	90'	+5,3 +4,9) +5,1 %	
	E _{3a} E _{3b}	120'	+1,2 +5,7) +3,4 %	25
	E _{4a} E _{4b}	150'	+4,2 +7,8) +6,0 %	
	E _{5a} E _{5b}	180'	+4,7 +3,5) +4,1 %	keine Reaktion

E ₂ 500 T 4-6°C FW=20'	E _{6a} E _{6b}	60'	+14,2 +11,2) +12,7 %	8'30"
	E _{7a} E _{7b}	90'	+11,2 + 7,9) + 9,5 %	30'
	E _{8a} E _{8b}	120'	+ 9,2 +10,6) + 9,9 %	Diskus
	E _{9a} E _{9b}	150'	+ 8,2 +17,0) +12,6 %	Diskus

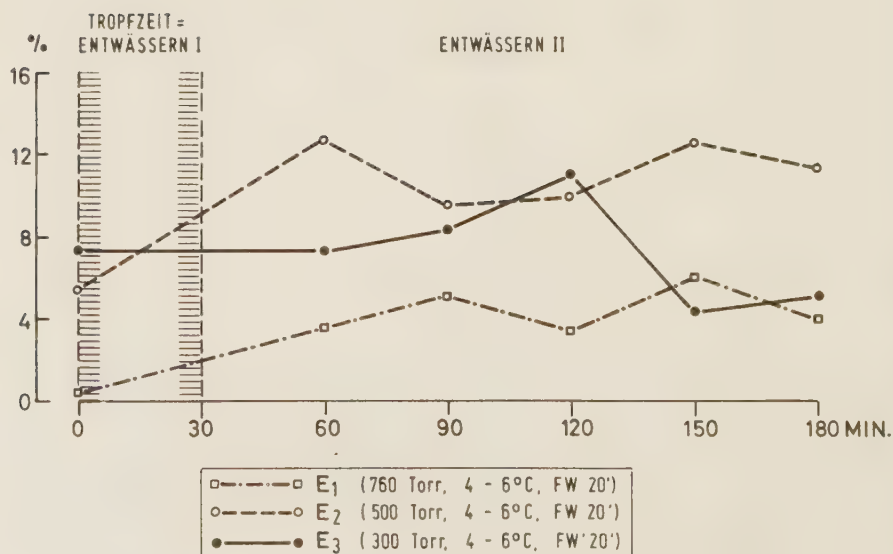
Tabelle 14 (Fortsetzung):

E ₂	Präp.	Zeit	Flächenänderung		Zeit bis zum völligen Farbumschl. d. Indik.
	E _{10a} E _{10b}	180'	+9,3 +13,2	) +11,3 %	Keine Reaktion
	E _{11a} E _{11b}	60'	+ 7,1 + 7,6	) + 7,3 %	9'15"
E ₃	E _{12a} E _{12b}	90'	+6,8 +9,8	) +8,3 %	45'
300 Torr	E _{13a} E _{13b}	120'	+10,8 +11,2	) +11,0 %	Diskus
4-6°C	E _{14a} E _{14b}	150'	+ 1,5 + 7,1	) + 4,3 %	Diskus
FW=20'	E _{15a} E _{15b}	180'	- 2,2 +12,1	) + 5,0 %	Keine Reaktion

Ergebnisse zu : E₁ : (760 Torr, 4-6°C, FW = 20')

E₂ : (500 Torr, " ")

E₃ : (300 Torr, " ")

Diagramm D₂₂

1. Flächenänderung : (Diagramm D₂₂)

Die Druckerniedrigungen bei E₂ und E₃ wurden nach Abschluß der Tropfzeit, also nach 30' angesetzt, die ersten Meßwerte nach 60' gewonnen. Es handelt sich wiederum, wie schon im Abschnitt Fixation um Vergleichswerte zu den Präparaten in ihrem Nativzustand. Aus dem Verlauf der Kurven läßt sich trotz der Schwankungen ersehen, daß das Gewebe bei einem Druck von 760 Torr, wie schon im Abschnitt Fixation, die geringste Neigung zur Quellung aufweist. Die 500- und 300-Torr-Kurven liegen deutlich höher, wobei festzuhalten ist, daß das Entwässerungsmittel Methanol trotz der bestehenden Kühltemperatur von 4-6 °C bei 300 Torr bereits zu sieden beginnt! Die vorliegenden Kurven ergeben keinen Hinweis auf eine gravierende Flächenänderung während des Abschnittes Entwässerung. Die im Diagramm aufgeführten Werte zu Beginn der Tropfzeit dienen lediglich als Anhaltspunkte, sie sind die Endwerte des Abschnittes Fixation für den jeweiligen Druck.

2. Farbumschlagdauer : (Diagramm D₂₃)

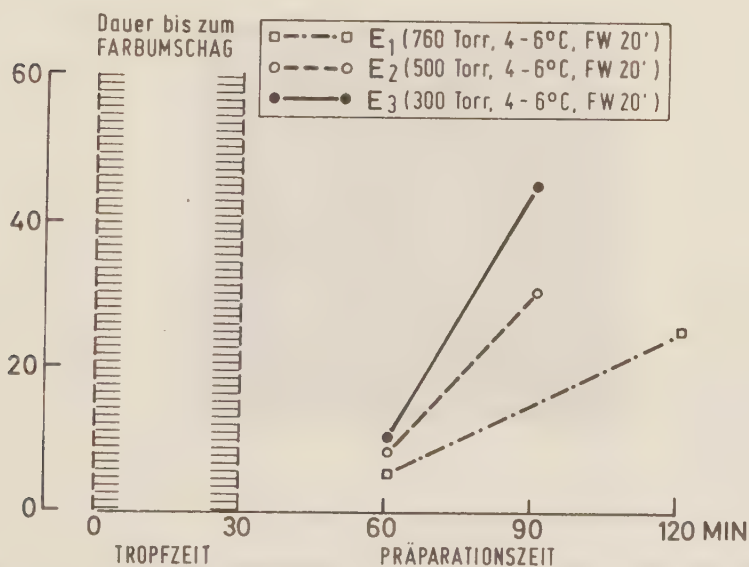


Diagramm D₂₃

Soweit es zu einem völligen Farbumschlag von tiefbraun nach hellgelb kam, wurden die Zeiten mit der Stoppuhr festgehalten und zeichnerisch ausgewertet. Druckerniedrigung wirkt sich demnach auf die Entwässerungsgeschwindigkeit positiv aus, die Dauer bis zum Farbumschlag ist bei 500 und 300 Torr nach 90 Minuten bereits länger als bei 760 Torr nach 120'. Bei den Versuchen E_1 bis E_3 zeigt sich, daß eine Gesamtentwässerungszeit von 3 Stunden ausreicht, um die Proben völlig zu entwässern.

3. Mikroskopische Beurteilung : Die auffallendste Beobachtung ist, daß die Zellen der bei 760 Torr ausreichend lange fixierten Milzproben durch die Fixation offenbar nicht in dem Maße stabilisiert werden, daß sie einen Unterdruck von 500 bzw. 300 Torr während der Entwässerung aushalten. Das mikroskopische Bild ähnelt dem der Unterdruckfixation, wenn auch die Zeichen der Schädigung nicht so ausgeprägt sind. Optimal bleibt ein Druck von 760 Torr (siehe Abb. 14 = Präp. E_{5a}), wenn es auch offenbar unter dem Einfluß von Methanol zur Ausbildung von interzellulären Zwischenräumen kommt.

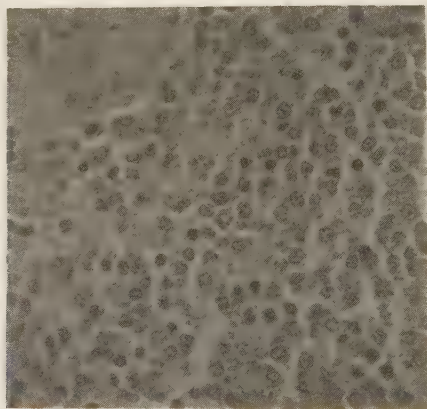


Abb. 14

Zusammenfassung von E_1 bis E_3

Unterdruck läßt sich auch bei der Entwässerung wegen Zellschädigung nicht einsetzen. Der Zeitaufwand der Entwässerung ist gering: Nach 3 Stunden sind die Proben auch bei Atmosphärendruck wasserfrei, eine gravierende Flächenänderung konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Entwässerung war die Wahl der Flüssigkeitswechselintervalle (FW) von besonderem Interesse, ergibt sich doch bei jeder neuen Portion von Methanol durch den Wasserentzug aus den Proben ein Konzentrationsabfall des Entwässerungsmittels in den Randzonen. Durch raschen Wechsel sollte diesem Wirkungsverlust begegnet werden.

Tabelle 15 :

	Präp.	Zeit	Zeit bis zum völligen Farbumschlag des Indikators
E ₁	E _{1a}	60'	5'
760 Torr	E _{2a}	90'	
4-6°C	E _{3a}	120'	25'
FW=20'	E _{4a}	150'	
	E _{5a}	180'	keine Reaktion

	E _{16a}	60'	12'
E ₄	E _{17a}	90'	42'
760 Torr	E _{18a}	120'	Diskus
4-6°C	E _{19a}	135'	Diskus
FW=10'	E _{20a}	150'	keine Reaktion

	E _{21a}	60'	11'
E ₅	E _{22a}	75'	28'
760 Torr	E _{23a}	90'	45'
4-6°C	E _{24a}	105'	Diskus
FW=5'	E _{25a}	115'	Diskus

Ergebnisse zu : E₁ : (760 Torr, 4-6°C, FW = 20')
E₄ : (" " FW = 10')
E₅ : (" " FW = 5')

1. Farbumschlagdauer (Diagramm D₂₄):

Eine Verkürzung der Flüssigkeitswechselintervalle wirkt sich beschleunigend auf die Entwässerung aus. Zwischen 20 und 10

Minuten ist der Zeitgewinn größer als zwischen 10 und 5 Minuten.

2. Mikroskopische Beurteilung : Eine Veränderung der Flüssigkeitswechselintervalle im Bereich von 5 bis 20 Minuten bringt keine Änderung der histologischen Bilder mit sich: die Ergebnisse bleiben gleich gut, lediglich E₅ weist bei nicht vollständiger Entwässerung zentrale Defekte auf.

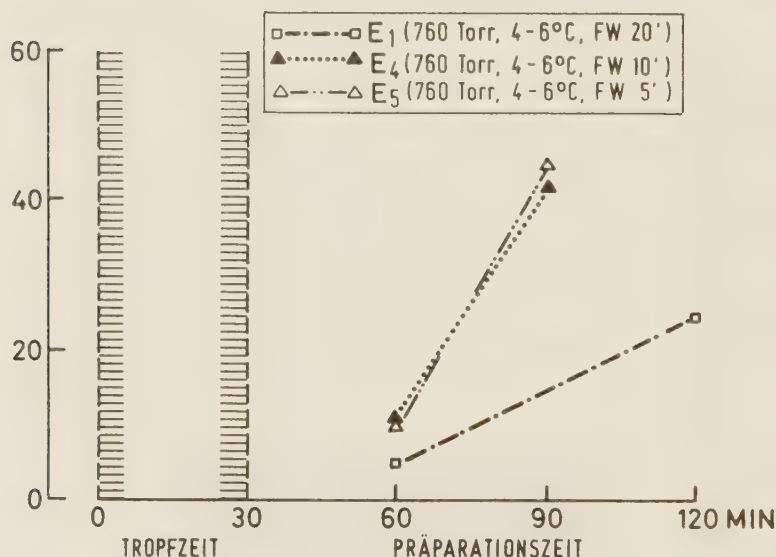


Diagramm D₂₄ (Dauer bis zum Farbumschlag in min.)

Wie schon im Abschnitt Fixation wurden auch im Abschnitt Entwässerung die Flächenänderungen der Proben nach Entnahme aus der Automatik und nach Gesamteinbettung gegenübergestellt. Für die Werte nach Gesamteinbettung stand jeweils nur eine Milzprobe zur Verfügung, da die Parallelprobe für den Wassernachweis herangezogen wurde!

Tabelle 16 : Präp. Zeit Fl.-änd. n. Autom. Fl.-änd. n. Ges+Einb.

E ₁ 760 Torr 4-6°C FW=20'	E ₁	60'	+3,5 %	+28,7 %
	E ₂	90'	+5,1 %	+27,0 %
	E ₃	120'	+3,4 %	+27,5 %
	E ₄	150'	+6,0 %	+15,2 %
	E ₅	180'	+4,1 %	+12,1 %

Flächenänderung: (Diagramm D₂₅) Bei nicht vollständiger Entwässerung der Proben (60-120') kam es zu starker Quellung, verbunden mit

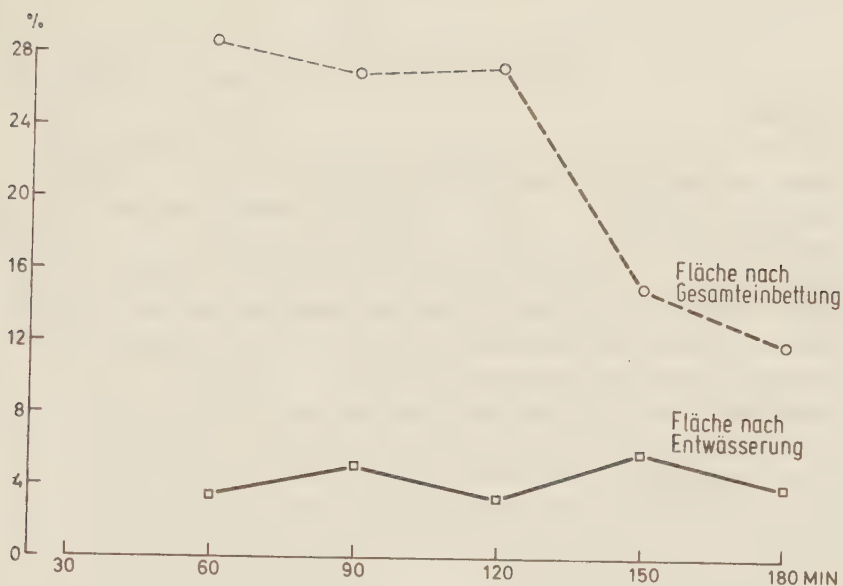


Diagramm D₂₅

Blasenbildung und Gewebeerstörungen, exakte Flächenmessungen waren wegen der verschwommenen und teilweise aufgerissenen Probenränder kaum möglich. Je vollständiger die Entwässerung mit zunehmender Dauer wird, desto geringer werden die Quellungsdaten nach Abschluß der Gesamteinbettung - der Kurvenverlauf spiegelt wieder, welchen negativen Einfluß mangelhafte Entwässerung auf die sich anschließende MMA-Einbettung hat!

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnittes "Entwässerung":

- 1) Auf ein Variieren der Temperatur wurde nach den negativen Erfahrungen bei der Fixation nun verzichtet, sie wurde konstant zwischen 4 und 6°C gehalten.
- 2) Unterdruck hat sich im Abschnitt Entwässerung erneut nicht bewährt, es treten Zellschäden auf, bei 300 Torr beginnt Methanol zu siedeln.
- 3) Isoliert betrachtet verkürzt Unterdruck die Entwässerungszeit.
- 4) Wesentliche Flächenänderungen gegenüber der Fixation konnten nicht festgestellt werden, die 760-Torr-Variante blieb gegen Quellung am wenigsten anfällig.
- 5) Vollständige Entwässerung ist Bedingung für gleichmäßige Poly-

merisation! Andernfalls kommt es zu erheblichen Quellungen und Artefakten.

- 6) Karl-Fischers-Reagens erweist sich als ein sehr empfindlicher, wegen der zeitlichen Abstufung des Farbumschlages hervorragend geeigneter Indikator für den Nachweis der Wasserfreiheit der Proben.
- 7) Eine Verkürzung der Flüssigkeitswechselintervalle führt zu rascherer Entwässerung, sie beläßt die gute Qualität der histologischen Bilder. Als rationell erscheint ein Flüssigkeitswechselintervall (FW) von 10 Minuten.
- 8) Damit ergibt sich für den weiteren Verlauf der Versuche für den Abschnitt Entwässerung folgende Kombination:

760 Torr, 4-6°C, FW = 10 min., Zeit: 3 Stunden

c) Abschnitt Einbettung

Mit der Bezeichnung "Einbettung" soll in erster Linie der Programmteil der Automatik angesprochen sein, wenn auch Messungen nach Abschluß der Gesamteinbettung in den Ergebnissen aufgenommen sind. Die Untersuchungen gliedern sich in 6 Versuche, bei denen Varianten von Flüssigkeitswechselintervallen (FW = 1h, 30', 15'), Temperatur (4°C, 20°C) und Druck (760 Torr, 500 Torr) erprobt wurden; die 300-Torr-Variante entfiel. Hinsichtlich der Flächenänderung wurden alle Milzpräparate ausgewertet, soweit sinnvoll auch nach Abschluß der Gesamteinbettung. Histologisch beschränkte sich die Untersuchung auf die vier letzten Präparate jedes Versuches (je zwei bei den letzten beiden Zeitwerten), weil eine unzureichende Acrylat-Durchtränkung für zu früh entnommene Proben von vorne herein zu erwarten war.

Tabelle 17 :

	Präp.	Zeit	Flächenänderung n. Entn.a.d.Automatik		Flächenänderung n.Gesamteinbettg.	
B ₁	B _{1a}	O=Ende d.	-2,1	)	-1,2%	
760 T	B _{1b}	Entwässerung	-0,3	)		
4°C	B _{2a}	1h	-0,5	)	+0,6%	
FW= 60'	B _{2b}		+1,7	)		
	B _{3a}	2h	+2,2	)	+0,4%	
	B _{3b}		-1,4	)		
	B _{4a}	4h	+1,8	)	+1,7%	+11,0
	B _{4b}		+1,6	)		+ 9,6) +10,3%
	B _{5a}	6h	-2,5	)	-4,3%	+ 8,7
	B _{5b}		-6,0	)		+ 7,1) + 7,9%
	B _{6a}	O=Ende d.	+8,5	)	+6,7%	
	B _{6b}	Entwässerung	+4,9	)		
B ₂	B _{7a}	30'	+9,8	)	+9,0%	
760 T	B _{7b}		+8,3	)		
4°C	B _{8a}	60'	+5,2	)	+5,3%	
FW= 30'	B _{8b}		+5,5	)		
	B _{9a}	120'	+4,5	)	+4,1%	+14,2
	B _{9b}		+3,7	)		+13,0) +13,6%

Tabelle 17 (Fortsetzung)

	Präp.	Zeit	Flächenänderung n. Entn.a.d.Automatik		Flächenänderung n.Gesamteinbettg.	
B ₂	B _{10a} B _{10b}	180'	+7,8 +6,2	) +7,0%	+14,8 +13,0	) +13,9%

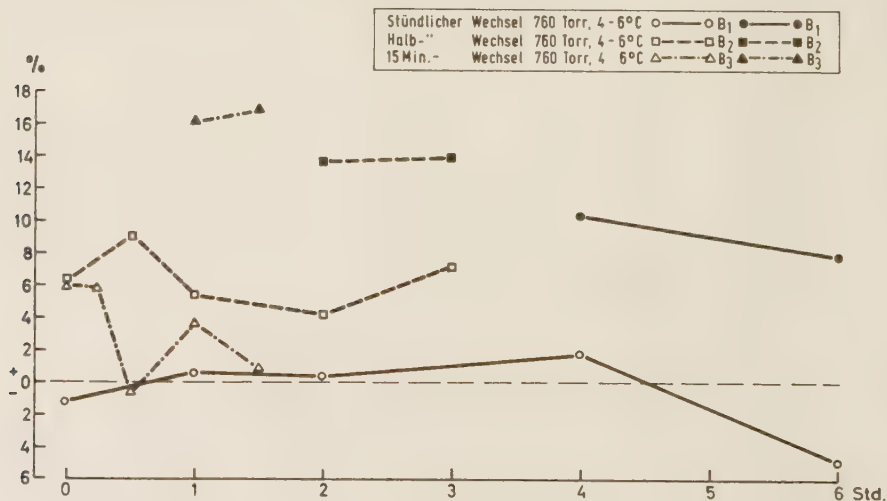
	B _{11a} B _{11b}	O=Ende Entwässg.	+6,1 +6,5	) +6,3%		
B ₃	B _{12a} B _{12b}	15'	+7,8 +3,8	) +5,8%		
760 Torr	B _{13a} B _{13b}	30'	-3,8 +2,7	) -0,6%		
4°C						
FW= 15'	B _{14a} B _{14b}	60'	+2,1 +5,5	) +3,8%	+14,9 +17,3	) +16,1%
	B _{15a} B _{15b}	90'	+0,9 +0,5	) +0,7%	+16,8 +16,0	) +16,4%

Ergebnisse zu : B₁ : (760 Torr, 4°C, FW = 1h)

B₂ : (" " FW = 30')

B₃ : (" " FW = 15')

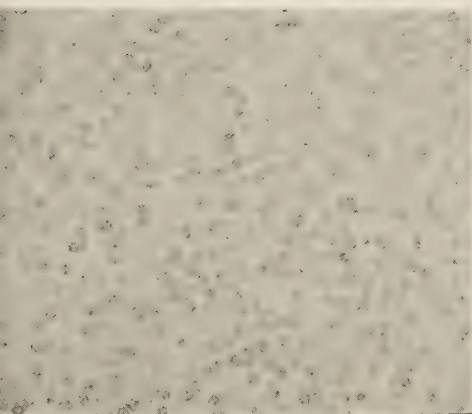
1. Flächenänderung: (D₂₆)

Diagramm D₂₆

Bei einem Flüssigkeitswechselintervall von 1 Stunde mit 6 Portionen Einbettungsgemisch verläuft die Kurve am gleichmäßigsten (B_1). Durch kürzere Wechselintervalle bei gleicher Portionenzahl ergibt sich eine kürzere Präparationsdauer, Flächenschwankungen werden deutlicher. Hinsichtlich der Flächenänderung nach Gesamteinbettung läßt sich feststellen, daß bei längerer Präparationszeit in der Automatik (bis 6h) die später folgende Polymerisationsquellung offenbar nicht so stark auftritt (B_1).

2. Mikroskopische Beurteilung:

- B_1 : (Abb.15 = Präp. B_{5a}) Schöne Zellen, gleichmäßiges Gesamtbild, z.T. geplatzte Erythrozyten.
 B_2 : (Abb.16 = Präp. B_{10b}) Ränder gering gequollen, Erys vielfach geplatzt, Granulozyten gut.
 B_3 : (Abb.17 = Präp. B_{15a}) Ränder gequollen, Erys vielfach geplatzt, eos. Granulozyten klein.



bb.15



Abb.16

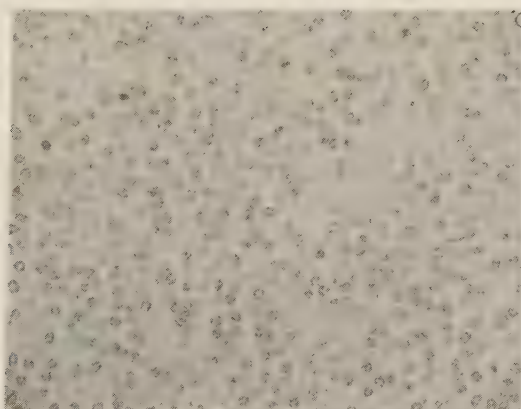


Abb.17

Nachdem für die Einbettung ein Flüssigkeitswechselintervall von 1 Stunde als gut erschien, sollten nun in den nächsten drei Versuchen (B₄ bis B₆) unter Einbeziehung von B₁ die Einflüsse von Druck- bzw. Temperaturänderungen auf diesen Abschnitt untersucht werden. Die Flächenänderungen nach Gesamteinbettung wurden in Tabellen und Diagramme (D₂₈ und D₂₉) mit aufgenommen.

Tabelle 18 :

		Präp.	Zeit	Flächenänderung n. Entn.a.d.Automatik		Flächenänderung n.Gesamteinbettg.	
B ₄ 760 Torr 20°C FW = 1h	B _{16a} B _{16b}	O=Ende d.Entwäss.		+6,3 +4,1	) +5,2 %		
	B _{17a} B _{17b}	1h		+7,2 +4,1	) +5,6 %		
	B _{18a} B _{18b}	2h		+13,5 -3,0	) +5,2 %		
	B _{19a} B _{19b}	4h		+1,8 -3,5	) -0,9 %	+24,5 +21,7	) +23,1 %
	B _{20a} B _{20b}	6h		+4,1 +7,3	) +5,7 %	+22,2 +25,2	) +23,7 %
- - - - -							
B ₅ 500 Torr 4°C FW = 1h	B _{21a} B _{21b}	O=Ende d.Entwäss.		+2,3 +0,2	) +1,2 %		
	B _{22a} B _{22b}	1h		+3,6 +4,8	) +4,2 %		
	B _{23a} B _{23b}	2h		+2,6 +0,5	) +1,5 %		
	B _{24a} B _{24b}	4h		+3,0 +0,8	) +1,5 %	+15,7 +13,1	) +14,4 %
	B _{25a} B _{25b}	6h		-2,9 -3,1	) +1,9 %	+12,9 +11,3	) +12,1 %
- - - - -							
B ₆ 500 Torr 20°C FW = 1h	B _{26a} B _{26b}	O=Ende d.Entwäss.		+7,1 +7,8	) +7,4 %		
	B _{27a} B _{27b}	1h		+3,8 +2,2	) +3,0 %		
	B _{28a} B _{28b}	2h		+7,2 +0,5	) +3,9 %		
	B _{29a} B _{29b}	4h		+1,1 +3,5	) +2,3 %	+25,6 +28,3	) +26,9 %
	B _{30a} B _{30b}	6h		+4,8 +7,0	) +5,9 %	+28,0 +30,2	) +29,1 %

Ergebnisse zu : B_1 : (760 Torr, 4°C , FW = 1h)
 B_4 : (760 Torr, 20°C , FW = 1h)
 B_5 : (500 Torr, 4°C , FW = 1h)
 B_6 : (500 Torr, 20°C , FW = 1h)

1. Flächenänderung : a) Diagramm D₂₇

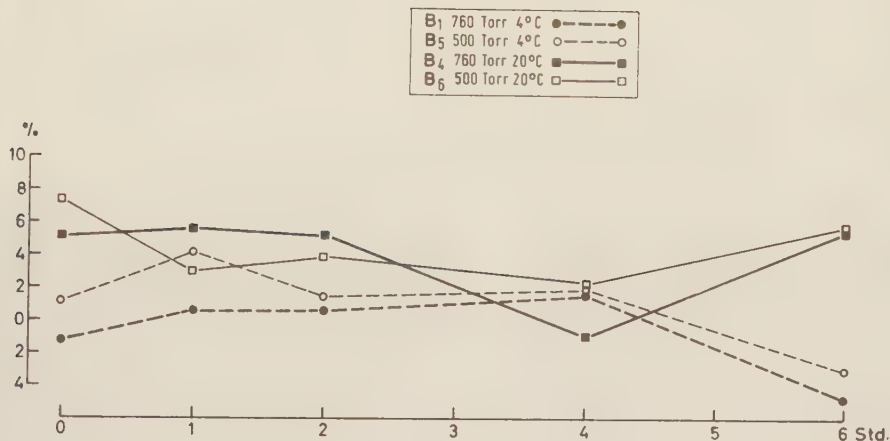


Diagramm D₂₇

Bei Kühlung zeigt sich gegen Ende der Präparationszeit in der Automatik sowohl bei 760 Torr als auch bei 500 Torr eine deutliche Schrumpfungstendenz der Proben, bei Raumtemperatur kam es bei der gleichen Kombination (760 und 500 Torr) zu einer abschließenden Quellungsreaktion. Vergleicht man die Kurven gleicher Temperatur miteinander, so fällt auf, daß Unterdruck etwas höhere Quellungswerte mit sich bringt . Dies deckt sich mit den Beobachtungen der vorangegangenen Abschnitte!

b) Diagramm D₂₈

Im Diagramm D₂₈ werden die beiden Versuche B_1 und B_4 gegenübergestellt, in denen der Druck konstant 760 Torr betrug und sich die Temperaturen unterschieden (B_1 : 4°C , B_4 : 20°C). Die Quellung nach

Gesamteinbettung ist bei Raumtemperatur stärker (B_4 bis zu +23,7% beim 6-Stundenwert).

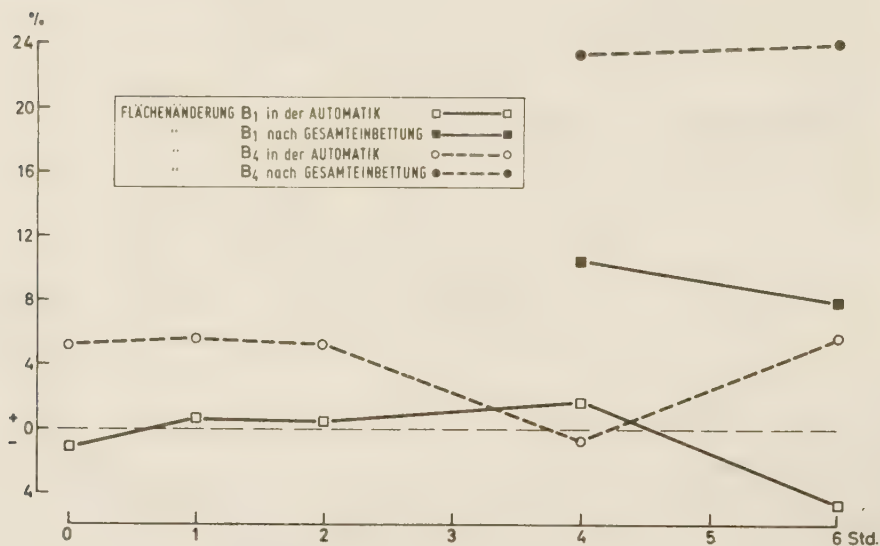


Diagramm D28

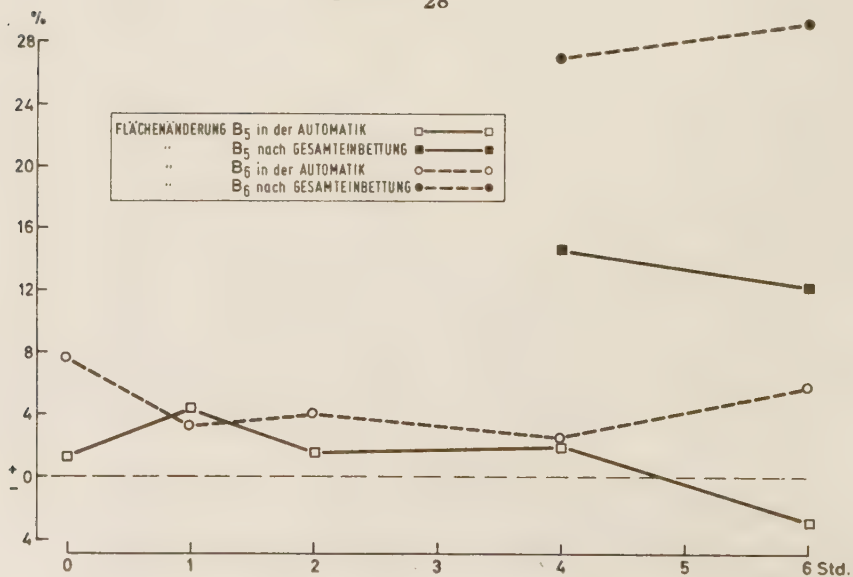


Diagramm D29

c) Diagramm D₂₉

Diagramm D₂₉ enthält den Vergleich der Versuche B₅ und B₆, die bei konstant 500 Torr abliefen und den gleichen Temperaturunterschied aufweisen wie B₁ - B₄. Bei Unterdruck und Raumtemperatur ist die nachfolgende Polymerisationsquellung noch stärker ausgeprägt, als bei Normaldruck und Raumtemperatur. (B₆ bis zu +29,1% beim 6-h-Wert)

2. Mikroskopische Beurteilung :

B₄ : (Abb.18 = Präp. B_{20a}) Ränder stark gequollen, Erys häufig geplatzt, Granulozyten schön.

B₅ : (Abb.19 = Präp. B_{25a}) Ränder mäßig gequollen, Erys gut, eos.Gran. und Granulozyten allgemein klein.

B₆ : (Abb.20 = Präp. B_{30b}) Ränder gering gequollen, Erys gut, Granulozyten sehr klein.



Abb. 18



Abb. 19



Abb. 20

Zusammenfassung der Ergebnisse des Abschnittes "Einbettung":

=====

- 1) Es kommt am Ende des Einbettungsabschnittes in der Automatik bei Kühlung zu einer Volumenabnahme der Proben (im Vergleich zu den Präparaten im Nativzustand eine Flächenänderung von -3 bis -5%), bei Raumtemperatur stellt sich eine Quellung vor allem der Ränder ein (um +5%).
 - 2) Stündlicher Flüssigkeitswechsel bei 6 Portionen Einbettungsgemisch scheint im Vergleich zu kürzeren Wechselintervallen bessere Ergebnisse zu bringen, wohl auch durch die damit verbundene längere Präparationsdauer in der Automatik.
 - 3) Auch im Abschnitt Einbettung bewirkt Unterdruck bei gleicher Temperatur im Verhältnis zum Normaldruck eine stärkere Quellung der Proben, Raumtemperatur führt gegenüber Kühlung ebenfalls zu höheren Quellungsraten.
 - 4) Die unter 3) genannten Beobachtungen lassen sich auch in Vergleichsmessungen der Flächenänderung nach Gesamteinbettung feststellen, durch die Polymerisation liegen die Werte allerdings deutlich höher.
 - 5) Das beste mikroskopische Resultat ergibt sich unter den Bedingungen von B₁.
 - 6) Bläschenbildung hat nach Abschluß des Automatikprogrammes nicht stattgefunden, bei der früheren Weiterführung präparatorischer Abschnitte (z.B. Fixation) außerhalb der Automatik kam es manchmal zu Bläschenbildung in den Polymerisaten. Es scheint, als ob die Automatik durch das völlige Ruhenlassen der Proben und die teilweise häufigeren Flüssigkeitswechsel (z.B. Entwässerung) ein gründlicheres und gleichmäßigeres Eindringen der jeweiligen Medien gewährleistet.
 - 7) Nach Abschluß des Abschnittes "Einbetten" in der Automatik ergeben sich dafür als geeignete Bedingungen:
760 Torr, 4-6°C, FW = 1h, 6 Portionen Einbettungsgemisch, Zeit: 6h .
-

Nutzen oder Schaden jedes einzelnen Schrittes der histologischen Präparation lassen sich aus dem Endergebnis nur unvollkommen ablesen. Bei dem Bemühen eine vielversprechende neue histologische Technik so rationell als möglich zu gestalten war deshalb über das Ausprobieren von Varianten hinaus nach Kontrollmöglichkeiten auch auf den einzelnen Stufen der Präparation zu suchen. Solche Kontrollen erscheinen desto notwendiger, je komplizierter die Bedingungen dieser Vorgänge werden. Dies ist besonders der Fall, wo Veränderungen der physikalischen Konstanten von Druck und Temperatur zur Wirkungssteigerung der physiko-chemischen Einbettungsprozesse benutzt werden. Obgleich die Literatur der histologischen Technik reicher an Hinweisen auf neue Modifikationen als auf Kontrollen und Standardisierung ihrer Methoden ist, fehlt es doch nicht an Versuchen auch auf diesem Gebiet. So lag es nahe, den zur Ergänzung des mikroskopischen Bildes früher herangezogenen Vergleich der Volumina von nativen und eingebetteten Geweben auf die Beurteilung der Wirkung von Fixation und Entwässerung auszudehnen, wie früher schon von BURKHARDT (7) vorgeschlagen. Dabei ergeben sich Abweichungen auch zwischen gleich behandelten Proben, die nur durch unterschiedliche Strukturen der Organstückchen selbst erklärt werden können. Diese Feststellung verdient Interesse, denn sie zeigt, daß eine zum Beispiel für ultramikroskopische und histo-chemische Zwecke wünschenswerte Standardisierung der histologischen Präparation von Geweben verschiedener Regionen oder gar Organe aus prinzipiellen Gründen nicht ideal verwirklicht werden kann. Die vorliegenden Beobachtungen lassen vermuten, daß diese Verhältnisse vor allem auf den unterschiedlichen Gehalt von Bindegewebe, Erythrozyten und Wasser auch in benachbarten Proben aus demselben Organ zurückgehen. Die Wahrscheinlichkeit, daß damit etwa auch die Verteilung an intra- und extrazellulären Elektrolyten, der Vernetzungszustand von Gerüstproteinen und der Polymerisationsgrad von Kohlehydraten unterschiedlich beeinflusst wird, sollte zu entsprechenden histochemischen Kontrollen anregen. Im Zusammenhang mit dem Zweck dieser Untersuchung erscheint die Feststellung wesentlicher, daß das lichtmikroskopische Präparationsergebnis nur von größeren Schwankungen der Gewebsvolumina nach Fixation und Entwässerung beeinflusst wird. Die Aufzeichnung solcher Schwankungen hat sich jedoch nichtsdestoweniger als brauchbar und in der beschriebenen Weise auch als

rationeller Indikator für eine gewebeschonende Präparation erwiesen. Nicht lösbar ist auf diese Weise die Aufgabe, das Ergebnis der Fixation und die der Fixation wahrscheinlich vorausgehenden Volumen- und Inhaltsveränderungen der Zellen und Zellorganellen als solche zu betrachten. Denn die der Fixation folgenden Präparationsschritte führen diese Veränderungen weiter. Die Entscheidung, wann der eigentliche Fixationsvorgang als beendet angesehen werden darf, wichtig, wenn es gilt Zeit zu sparen, ist nach den vorliegenden Ergebnissen nur aus dem histologischen Resultat und aus der Beobachtung der relativen Volumenkonstanz während der nachfolgenden Maßnahmen indirekt zu treffen. Die zuletzt genannte Beobachtung eröffnet einen relativ einfachen Weg zur experimentellen Beurteilung dieser Frage. Als weniger brauchbar erweist sich dagegen der zusammen mit dem Eindringen der Fixierlösung auftretende Farbumschlag. Er markiert nicht den Ablauf der Fixation, sondern lediglich das Eindringen der Fixierlösung. Die Reproduzierbarkeit und Gleichmäßigkeit dieser Erscheinung macht es wahrscheinlich, daß sie durch Diffusionsvorgänge bestimmt wird. Dafür spricht auch die Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem Modellversuch auf Chromatographiepapier. Diese Feststellung ermöglicht es, die Frage des gleichzeitigen Eindringens der einzelnen Komponenten eines Fixiermittels in das Gewebe im Modellversuch zu überprüfen. Für das hier verwendete Formol-Methanol-Gemisch kann übereinstimmend gezeigt werden, daß beide Komponenten gemeinsam wandern mit einer Geschwindigkeit, die zwischen dem raschen Vordringen von Methanol und dem relativ langsamen von Formol liegt und daß dieses Vordringen durch Abkühlung verlangsamt wird. Nur an Organstückchen läßt sich zeigen, daß Unterdruck aus der Umgebung das Vordringen der Lösungen noch stärker beschleunigt. Daß diese Erscheinung an Chromatographiepapierstreifen fehlt, liegt wohl daran, daß hier Druckdifferenzen zwischen innen und außen sich kaum auswirken können. Das mikroskopische Ergebnis dieser Versuche zeigt jedoch einerseits, daß die Forderung nach rascher Unterbrechung der Nekrolyse durch beschleunigtes Eindringen der Fixiermittel und nach Abkürzung der Präparationszeit nicht mit einem optimalen histologischen Ergebnis vereinbar ist, und andererseits, daß Zell- und Gewbeschädigungen nach Methanol-Formolfixation nicht durch das Vorseilen einer Komponente, sondern wahrscheinlich durch einen zu raschen Wirkungsablauf, der im einzelnen noch zu klären bleibt, entstehen. Daß sich unter den Bedingungen von Normaldruck und Temperatursenkung die verlangsamte Fixation und die Hemmung der Nekrolyse zu einem optimalen Ergebnis ergänzen, wird durch diese

Befunde bestätigt.

Der Wert der Kontrollen der auf die Fixierung folgenden Dehydratation besteht in der Bewährung eines empfindlichen, quantitativ auswertbaren Wassernachweises für histologische Zwecke und in der Feststellung, daß dieser Abschnitt erheblich kürzer und materialsparender gehalten werden kann als bisher üblich. Es darf dabei davon ausgegangen werden, daß die Elimination von Wasser auch die Elimination von Formol bedingt. Ein normierbarer Ablauf der Durchtränkungsphase des Objektes mit dem Einbettungsmittel ist besonders erwünscht, wenn dieser Vorgang stör anfällig ist. Dies gilt für das Einbettungsmittel Methacrylat besonders gegenüber mechanischer Erschütterung, Wärme, Licht und Wasser. Außerdem war ein längeres Aufrechterhalten von Unterdruck zur Beseitigung von Gaskeimen, die bei der nachfolgenden Polymerisation als Blasen störend in Erscheinung treten und zur Beschleunigung der Durchtränkung bisher für notwendig gehalten worden. Die Versuchsanordnung hat die Aufrechterhaltung konstanter Bedingungen bei der Auswertung des gesamten Einbettungsvorganges ermöglicht. Sie hat ferner gezeigt, daß die Anwendung von Unterdruck auch in dieser Phase des Einbettungsprozesses mehr Nachteile als Vorteile bringt, daß eine kostspielige Vermehrung des Austausches von Einbettungsmittel unterbleiben kann und daß Unterkühlung beim Durchtränken einer späteren Quellung der Gewebe während der Polymerisation entgegenwirkt. Die Erprobung einer Versuchsanordnung hat außerdem gezeigt, daß der zeitliche und personelle Aufwand einer anspruchsvollen histologischen Einbettungstechnik durch Automatisierung erheblich verringert werden könnte. Sie hat zugleich die Bedingungen gezeigt, die bei einer solchen Automatisierung eingehalten werden müssen. Frühere Erfahrungen (7 , 8) und im Lauf der Untersuchungen durchgeführte Vergleiche machen es wahrscheinlich, daß die gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Gewebe anwendbar sind.

Zur Verbesserung der Kenntnisse über den Einfluß variabler Parameter auf die Einbettung von Organgewebe in ein Methyl-Methacrylatgemisch werden die Auswirkungen von Druck, Temperatur und Zeit auf die histologische Präparation von Milzstückchen geprüft. Zur Konstanterhaltung der Versuchsbedingungen, zugleich als Modell für eine spätere Automatisierung des Verfahrens, wird ein automatisches Gerät eingesetzt und funktionsfähig gemacht. Als Parameter dienen makroskopisch Volumenänderung und Farbwechsel der Gewebe, mikroskopisch die vergleichende Photographie von Zellen und Geweben in gefärbten Schnittpräparaten. Zum Studium des Fixationsvorganges wird ein Modellversuch entwickelt.

Das praktische Resultat besteht in erheblicher Materialersparnis und in einer Verkürzung der gesamten Präparationszeit auf 16 Stunden (für Milzproben).

Der theoretische Gewinn besteht in folgenden Erkenntnissen: Die Fixationswirkung von Methanol-Formol ist spezifisch. Sie ist der Wirkung der einzelnen Komponenten überlegen. Die ausschließliche Anwendung des gewebebefreundlichen Methanol zur Entwässerung ist ausreichend. Fixations- und Durchtränkungsvorgänge sollten weder durch Druckerniedrigung noch durch Temperaturerhöhung beschleunigt werden, sie laufen am besten bei Unterkühlung ab. Die Wirksamkeit von Fixation, Entwässerung und Durchtränkung läßt sich durch häufigeren Substanz austausch nicht beliebig steigern. Eine Automatisierung der im Routinebetrieb verhältnismäßig aufwendigen Methode ist mit vertretbarem Aufwand möglich.

- 1 AGODOA, L.C.Y., STRIKER, G.E., CHI, E.: Glycol methacrylate embedding of renal biopsy specimens for light microscopy. Amer. J. clin. Path. 64, 655 (1975).
- 2 AGODOA, L.C.Y.: Glycol methacrylate embedding in routine clinical histopathology and research. Amer. J. clin. Path. in print.
- 3 BENNET, H.S., WYRICK, A.D., LEE, S.W., MCNEIL, I.H.: Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. Stain Technology 51, 74 (1976).
- 4 BERTOLINI, R., HUTSCHENREITER, I., SCHEUNER, G.: Untersuchungen zur Quellung von Kollagen nach unterschiedlicher Fixation. Exp. Path. 6, 65 (1972).
- 5 BOELLARD, I.W., HIRSCH, TH.v.: Methacrylsäureester als Einbettungsmittel in der Histologie. Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie und mikroskopische Technik 64, Heft 1, 24 (1958).
- 6 BOELLARD, I.W., HIRSCH, TH.v.: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylsäureester. Mikroskopie 13, Heft 11/12, 386 (1959).
- 7 BURKHARDT, R.: Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. Blut 13, 337 (1966).
- 8 BURKHARDT, R.: Histo-Biopsie von Knochenmark und Knochen. Sandorama IV, 11 (1969).
- 9 CATHEY, W.I.: A plastic embedding medium for thin sectioning in light microscopy. Stain Technology 38, 213 (1963).
- 10 DANCEY, I.T., DEUBELBEISS, K.A., HARKER, A.L.: Section preparation of human marrow for light microscopy. J. clin. Path. 29, 704 (1976).

- 11 DELLING, D.: Über eine vereinfachte Methacrylateinbettung für unentkalkte Knochenschnitte.
Praxis 145, 100 (1972).
- 12 DIFFORD, I.: A simplified method for the preparation of methylmethacrylate embedding medium for undecalcified bone.
Med. Lab. Techn. 31, 79 (1974).
- 13 EGER, W., GÖTZ, F., KÄMMERER, H.: Herstellung von Dünnschliffen aus Knochen und Weichgewebe nach Markierung mit Tetracyclinen.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 306, 205 (1964).
- 14 PETERSDORFF, V.v., BUCHARTOWSKI, W.-D., JAEKEL, E., LABUHN, H., LIPPERT, H., LUHMANN, A., THEDENS, O., VOHLAND, I.: Arbeitsanweisung für die Methylmethacrylateinbettung unentkalkter Knochenkompakta für polarisationsoptische Untersuchungen.
Zeitschr. f. Wissenschaft und Mikroskopie 70/71, 213 (1971).
- 15 POTTER, A.R.: A technique for thin methacrylate sections of bone marrow.
Med. Lab. Techn. 31, 145 (1974).
- 16 SINGLETON, G.T., KOHUT, R.I., ADKINS, W.: Control for vacuum embedding medium for undecalcified bone.
Ann. Otol. 82, 395 (1973).
- 17 STICKLAND, N.C.: A detailed analysis of the effects of various fixatives on animal tissue with particular reference to muscle tissue.
Stain Technology 50, 255 (1975).
- 18 STOUT, S.D., TEITELBAUM, S.L.: Histological analysis of undecalcified thin sections of archeological bone.
Amer. J. Phys. Anthropol. 44, Nr.2, 263 (1976).
- 19 VYKOPIL, K.-F., THIELE, J., GEORGII, A.: Histochemical and immunohistochemical techniques on acrylate embedded bone biopsies.
Blut 32, 215 (1976).
- 20 ZAMBERNARD, I., BLOCK, M., VATTER, A., TRENNER, L.: An adaption of methacrylate embedding for routine histopathologic use.
Blood 33, Nr.3, 444 (1969).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Burkhardt für die Überlassung des Themas, für seine kritischen Ratschläge und wertvollen Diskussionen.

Mein Dank gilt insbesondere auch den Damen des Labors der Abteilung, W.Sommerfeld, C.Macher, R.Münich, G.Böhm, E.Zumbach.

Lebenslauf

Am 27. Juli 1943 wurde ich als drittes Kind des Rechtsanwalts Dr. Ernst Bayerlein und seiner Ehefrau Luise, geb. Götz in München geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Vaterstetten bei München, wo ich auch die Volksschule von 1949 bis 1954 besuchte. Ich trat in die Luitpoldoberrealschule München über und legte dort im Sommer 1963 die Reifeprüfung ab. Es folgte ein Jahr Bundeswehrzeit, ich wurde als Fähnrich der Res. entlassen. Im November 1964 immatrikulierte ich mich an der med. Fakultät der Universität München. Im Frühjahr 1969 verstarb mein Vater. Nach dem medizinischen Staatsexamen im Dezember 1970 erhielt ich nach abgeleiteter Medizinalassistentenzeit im März 1972 die Approbation. Von Mai bis September 1973 bezog ich ein Doktorandenstipendium aus Mitteln des Freistaates Bayern. Es folgte eine internistische Ausbildung im Kreiskrankenhaus Ebersberg bis Juli 1975; danach vertrat ich häufig in mehreren Arztpraxen. Vom 1. Juli 1976 bis 30.9. 1977 arbeitete ich chirurgisch und gynäkologisch im Parkhospital in München bei Chefarzt Dr. Hirtl. Dort erlernte ich auch die Grundlagen der Anästhesie. Am 6. Mai 1978 verehelichte ich mich mit der Sozialpädagogin Hildegard Sachs.

